

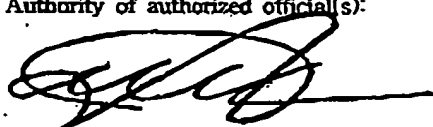
-BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1

TO : KIM, Jin-Hoi
Gyeongsang National University,
#900, Gazwa-dong, Chinju 660-701,
Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Escherichia coli</i> DH10/pUP2	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 10352BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on October 17 2002 .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) #52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejeon 305-333, Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of authorized official(s):  PARK Yong-Ha, Director Date: October 21 2002

1/4

PCT REQUEST

03PP181

Original (for SUBMISSION) - printed on 04.11.2003 02:37:30 PM

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form - PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.04.2003)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	Korean Intellectual Property Office (RO/KR)
0-7	Applicant's or agent's file reference	03PP181
I	Title of invention	PORCINE UROPLAKIN II PROMOTER AND THE PRODUCTION METHOD OF USEFUL PROTEINS USING SAID PROMOTER
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	CHO-A PHARM CO., LTD.
II-5	Address:	1st Floor, Acetechno Tower, 55-7, Moonrae-dong 3-ga, Yeongdeungpo-ku, 150-835 Seoul Republic of Korea
II-6	State of nationality	KR
II-7	State of residence	KR
II-8	Telephone No.	+82 2 2166-4013
II-9	Facsimile No.	+82 2 2166-4111
II-10	e-mail	sunny@notes.choa.co.kr
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	all designated States
III-1-4	Name (LAST, First)	KIM, Jin-Hoi
III-1-5	Address:	102-803, Chunggu Apartment, Chojeon-dong, Jinju-city, 660-360 Kyeongsangnam-do Republic of Korea
III-1-6	State of nationality	KR
III-1-7	State of residence	KR

2/4

PCT REQUEST

03PP181

Original (for SUBMISSION) - printed on 04.11.2003 02:37:30 PM

IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name	DARAE PATENT FIRM
IV-1-2	Address:	10th Floor, KIPS, 647-9, Yeoksam-dong, Kangnam-ku, 135-980 Seoul Republic of Korea
IV-1-3	Telephone No.	+82 2 3475-7700
IV-1-4	Facsimile No.	+82 2 3475-7788
IV-1-5	e-mail	admin@daraelaw.co.kr
V	Designation of States	
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	<p>AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT</p> <p>EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT</p> <p>EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT</p> <p>OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT</p>
V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	<p>AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW</p>

3/4

PCT REQUEST

03PP181

Original (for SUBMISSION) - printed on 04.11.2003 02:37:30 PM

V-5	Precautionary Designation Statement In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.	
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	04 November 2002 (04.11.2002)
VI-1-2	Number	10-2002-0067856
VI-1-3	Country	KR
VI-2	Priority claim of earlier national application	
VI-2-1	Filing date	03 November 2003 (03.11.2003)
VI-2-2	Number	10-2003-0077256
VI-2-3	Country	KR
VI-3	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1, VI-2
VII-1	International Searching Authority Chosen	Korean Intellectual Property Office (KIPO) (ISA/KR)
VIII	Declarations	Number of declarations
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-

4/4

PCT REQUEST

03PP181

Original (for SUBMISSION) - printed on 04.11.2003 02:37:30 PM

IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	4	-
IX-2	Description (excluding sequence listing part)	29	-
IX-3	Claims	8	-
IX-4	Abstract	1	EZABST00.TXT
IX-5	Drawings	7	-
IX-7a	Sub-total number of sheets	49	-
IX-6	Sequence listing part of description	20	-
IX-7	TOTAL	69	-
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-16	Sequence listing in computer readable form:		
IX-16 (II)	additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	-	1 Diskette
IX-17	PCT-EASY diskette	-	Diskette
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	1	
IX-20	Language of filing of the international application	Korean	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name	DARAE PATENT FIRM	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/KR
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

[명세서]

[발명의 명칭]

- 돼지의 유로플라킨 II 유전자의 프로모터 및 이를 이용한 유용단
- 5 백질의 생산 방법 {Porcine uroplakin II promoter and the production method of useful proteins using said promoter}

[기술분야]

- 본 발명은 돼지의 유로플라킨 II(uroplakin II) 유전자의 프로모터
- 10 (promoter) 및 이를 이용한 유용단백질의 생산 방법에 관한 것이다.

[배경기술]

- 의약 분야에서 경제적 부가가치가 높은 EPO 등의 생산을 극대화하
- 는 방법으로서, 세포배양법에 의한 대량생산방법이 주로 사용되어 왔다.
- 15 그러나, 이 방법은 동물의 혈액을 배양 배지로 이용하기 때문에 생산 비용이 높아지고, 배양기술에 있어서 전문적인 지식이 요구된다. 또한 배지성분에 함유된 동물의 EPO와 새로 생산한 EPO를 완전히 분리하는 것이 불가능하기 때문에 최종적으로 얻는 EPO의 순도가 낮고, 활성이 낮다는 문제점이 있다.

- 20 반면 형질전환동물을 이용한 유용단백질 생산 방법은, 동물이 분비하는 체액 중에 목적단백질이 포함되므로 기존의 세포배양법에 비해 목적단백질의 분리·정제가 용이하며, 활성 또한 우수하게 유지되므로 이 분야에 대한 관심이 급증하고 있다.

- 현재까지의 형질전환동물 생산기술에서 목적단백질을 생산하는 조
- 25 직은 주로 단백질 발현율이 높은 것으로 알려진 유선 조직이었다. 그러나 동물실험 결과, EPO와 같은 몇몇 중요한 단백질의 경우, 우유(milk)에서의 발현은 유선조직 이외의 타조직에서의 발현 때문에 궁극적으로 목적단백질을 생산하는 것이 불가능한 것으로 나타났다. 또한 우유에는 원래 알부민 등 여러 종류의 단백질이 다량 포함되어 있으므로, 결과적인 목적 단백질 수율은 낮아진다.
- 30

이러한 문제점을 극복하기 위하여, 방광을 이용한 유용단백질 생산 방법이 최근 시도되고 있다.

- 방광은 동물의 연령이나 성에 상관없이 일생에 걸쳐 소변을 생산하며, 소변 중에는 단백질 및 지방 성분이 5~25mg/l 수준의 극소량만 포함되어 있어 목적단백질의 분리 및 정제가 훨씬 용이하다.

그러나 지금까지 개발된 방광특이적 프로모터를 이용하여 형질전환된 동물의 단백질 생산 효율은 실제로 매우 낮은 수준에 머무르고 있다.

따라서, 목적단백질 발현을 높은 효율로 촉진하는 방광 특이적 프로모터의 개발이 시급하다.

- 본 발명에서는 돼지의 방광에서 특이적으로 목적단백질의 발현을 촉진하는 유로플라킨 II 유전자의 프로모터를 분리하고, 이를 이용하여 유용단백질을 대량 생산할 수 있는 방법을 제공하고자 한다.

[발명의 상세한 설명]

- 본 발명은 돼지의 유로플라킨 II 유전자의 프로모터를 제공한다.

본 발명의 돼지 유로플라킨 II 프로모터는 구체적으로 서열번호 1의 염기서열을 갖는다.

- gggctaggagtggaatcagagctggcctatgccacagcaacgcagaatccaaaccacatctccgacctaca
ccagaccgtcaccataacacaggatccttaacccactgagcaagggtcagggtacaaacccaaatcctcatggatactag
cgggttcttaaccgctgagccacagtgggcactcctgttttgtttgtcttcgtttttggctgcatctgcagcatacagaa
gttcctgggttaaggattgaacccatgccacagcagcaacccgagccacagcagtgacaacagcctgatccttaactgct
agaccaccagggaacgccccctcaacttttcatgccttggaaacccctgagtcagtacaacctgacaatngntttttttttt
tttttgccttttctagggccacttcccgccgcatgtggagattcgcaggctanagggtctaactggagctgtagccaccggc
ctacaccagagccatagcaacgagggatccgagccgagtcgtgaacctacactacagctcatggcaacaccggatcggt
aaccactgagcaaggccaggggatcgaacccgcaacctcatggttcctagtcagattcgtaaccactgcacatgaca
ggaactcccaacctgacaattttatcatttctgcaccctagtgttgtagtaatttgaaaaattcccaagatgtcaaggtcagtg
gatggttaattttatgtgtcaacctgactaggccatgttgccggatgtggagtcattgtattctggatgttactgtgaagatat
gttttgatgaaattaacatttaaatcagtgggggaaaaaagaagttctcgttctgtgcatcagaaacaaatccgacta
ggaaacaagcgggtgcaggttcgatccctggcctcacttagtggagtcaggatctggcgttgccgtgagctgtgtgtag
gtggcagatgcagctcgatctagcattgctgtggctgtggtgtagggccagcagctgtagctctgattaaaccccaagtct

gggaacctccatagccgtgggtgtggccgaaaaagcaaaaaataaataaataaataaatttaaaccaggggatttgag
caaagcagattaccccataatatgggtgggtctcatcaagttcattgtaggccctagtggacaagaccgacctccacctt
ctccccatgagaaggaaagaattctgccaaaagaccgccttnggacntaaactgcaactctttctgagttccagcatgtt
ggcctcccccatcagacttggacttggcaagcctccgcaattgcatgagccaattccttaaaataaatccgtctatatatac
5 acatcctgttgggtctgtttctccagagaacctgactaacgcagctctgcacccctgaagaccagtgggtcccacactcagc
tgggtgtcacctccaaacactcagccttctcaaggctctttctagctgtgtcctcctctcccacacagctgtttcaaac
tcacccctcttcaggggcgaatcccttctcctcctgagtttctacttcccagagaaagcagagacctcaggagtgtgt
gccttaacttacttcttcatccctcagccttgcaaaagtataagctttctctgcaccactgccccattcttctctgcagacag
ggctattcctaaagccaaacgtaatgcctccacctctgatctgagtcctcttttccctcctccagaagcttctcataaatt
10 ctacccctcttttcttctatctttatctttgaaaacaaaaatggaagacagccttcccgttgggtgcagcggaaacagtggg
ccttggaaagcgtgggacgcaggttcgacccctggccagcatagtaggttaaggatccagtgttgccacagtttggctt
agattgaaactgcagctcagatctgtccctggcctgggaacttcatacggccacaggacggccaaaaagaaaagaaag
aaaaaataaaaaacaaaacagaaaagccttctgtacccccaattccctccagttatctctcttcttccctcccagccaag
ctctgcaaagagcggctgtgcacagtttaactctacctcctccagttggcctggactttctcagctgtggttctacccccct
15 caccgtaggaatctgctctgaaggacacgcacccctcacgatccttggccaggacattttgtaccagccttcaatc
ctgaccttcataatccgacacctccttctgaaacctccatccatttctcctgttccctcctaagacccattccgcctt
cttcagccccctccctccatctgtcctttagatgccgatttccctagatcctgtcctgcgcggctcgtccttccctccacaa
ctctctcaaggactcttttctccatgtgcgatttggccatggccaccttccctctcttaccagacttccccgggtgtcc
agactcatagactcaattatgaaaacatagtttctatctgatttggccaagatatttgacattgtattactgtataacagcttct
20 ccccaatttagtggttataaaataaacacttattctgagaatcagaaacctaggcaggacatagttgggtctcatgaagt
gcactgaaaatgtccccctgggctaatacagaggactgaccagggtggaggatctgtccaagctcattcattcaca
tggccgtagggtggagacagctcttctgtgatcttggcaggagcctcaattcctgtcacgtggacctccccctggagggg
gtcccatgtcctccatgggtgagtaatccatgagagcaagggtggaagggtgccatgccatttaggacctagcctcaggaggg
acctacgtcacttctgtttagtctgttggccacacagactaacctgacacaatgcacccatccatgacctgtgccagtc
25 cattctccacactgtttccagaatgatattacataagtaaaactcctcaaaggctttgagattttttccattatagttgattta
taacctcagaggcttttgtttcttcagcataaaaaaccaagttccttaacatagcatgtaacctggtccacctggtccagt
gctagaactctccatgtccatccttgaatactgtttctagccaagagctattgtttgcagttccagaatgtgtcgggata
actcacatctctgagcctttcatgtgtgttccctcacttggaaatccccttccatttaggaaggctaagtcattcattntc
caaaactcagaagcaaatTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTgcttttagggccgaactctcagcataggagggtcccaggtta
30 gccatcaaattggaattgtagctgtgtgcctacaccacagccatagcaacaccagaccaagtcacatctgcaacctacat

cacagatcatggcaatactggatccttaaccactgagtgagcccagggaicaaacacaaattctcatggafactgccag
gttcattaccactgagccacaacaggaaactcctctcttttatggcacacctgcagcatatggaagttcctgggccagg
attgaatctgagtgccagctgtgacaatgccgtatcctttaattcactgtgctgggctgaggggntaaantgccccctctaa
aaaacctgagctgctgcagttggattcttaatccactgcaccacaagggggaaggtcaagaactgtcttgccatctctglat
5 cttatcacctagcatagtaccacccatagagaagttgctcaacaaatgtttactgaatgaataaatgcatgagctggagttcc
cattgctggctcagcagtaacaaacctgactagcattcataagaacttgggttcgatccctagcctcagtggttaaggatgc
agcattgctgtgagctgtggtgtaggtgcagacgacactcagatccacattgctgtcactgtggcgaggccggcctct
gtagctctgattcgactcctagcctgggaacgtccatagccacaggtgaggccctaaaaagaaataaataagcaagcaa
gtaagcaagcaggcagtttcttggtgccttgacctgtggcctgtgtgtatataagtaacagctgatccatgtctcagtc
10 atgtttcccccctcagactacctttcctgccccatctctcccttgacataattggaaaaacaaattcagaattttgtccactacc
tttcttgctagctctgtggccttgggaaagctattatgtcctctgagcctctaattttcatctgcaccaaggattaataaaaagg
agaggataagatgaattacttatattaattttattgaaccagatactgtgctaggcactcttaataaattagcttgagtata
gtcatagtatcctggtgagacagatttttttctttatgggtgcacgtgcaacatatggaagttcctgggctggggctgaat
tggagctgcagggtcttgccatgccacagccatggcaacatcatatacaaacgcacctgtgacctacaccacagattgc
15 agcaacgctggatccttcacccaaggagcaaggccaggaaatcaaatgtgcatcctcacaacactatgtccggttttaac
ccgctgagccacaccaggaactccatggcgagacagattttatactctgtctacagaagaggaaagtgaagctcagaatg
gttaggttagtaacttgccaagatcaaaaaattcaagaagatttggggcaagtgggtatcatggcagcattagaaaa
aataaagaagcatccactgtttccaactgaacaactgagattttctactctcacagcttttccagcttcataccaagga
cagacgctctgccattttccatcagaccaatatttgcgaacactgcacctttacttttaggtccaagtcaccaggggtttcc
20 cagtttgcctcagactctgacactatctccacattttttgcacctttattttaagcattttatacctgtcataccttgctaga
taaatgggaaggatgaatcttccatttataggtgagaaaattgaggttcaaagtgactcaccaaaagtcatatagcatca
ctcctcaacaggaggacagcagtcaccaccagagggtaacatgtccatggagcctagtggacacatttttctaactgactg
ggaagcagcagagtggtattgtgaagggggaatcataggtatatcaaacagacttaggttctgatccgagctattctgcttg
caaacaaccatagttcaatttaaaaaaaaaaagaagaagaagaagaagaaggagccccatcctggtgcagtggaa
25 acaaattcaactaggaactgtgaggttgggttcgatccctggccttgctcagtggttaaggatctggcgttgccatgag
ccgtggtgtaggtgcagactcaactcagatctggcgttgctgtgactgtggctgtgatgtaggttggcagctgtaactccg
gttagaccccagcctgggaacctccatagcaacctccatgcgggtgggtgtggccctaaaaagaaaaaaaaaaaaaa
aagaggaattcccttatggctcagcaggttaaggatctggtattgtcactgctgtggctctagttacagccatagtgcaggtt
caatccctggcccagggaacgtctgatccacaggtgtggccaaaaaagaagaagaaggaggttctgtgtggcaca
30 ataggattggcaacatcttaggagtactgggacacaggttcaatccctggcccagcacagtggttaaggagccagtggtg

ctgggtcaaaaaagaaaaagaaaagtaccatagttagagtaaattctgttttaggagctattctttggggcagaacagagagat
caggagctccttgagagcagaaacttacctttacatccctcgtgcctagcacggttctaggggcatacctggtatttaataaa
tatagccaaactggataggggattggaaggaaagagcaggggagggaaacttgagtgaattgaaaaattgagaatccaaa
ggggagacagcctagaaagagtaggtccaagaaagagatcccaggcatttggccctggtccctttttccaagccatg
5 aggaaatcctcagaggaacagagtgctgtggctttaaatgacttcagcgttgcaatgaatctgctcggctaaaagagttat
cctctgtccttcgctgttcctccccctccctcagctcccaaaccttctcggctgctgtgatgggataattagatgcgag
agctcagcacagatgatgtccagttgcctagcaactaatggtttccatggagaccgcaaagcacagcctccagagcag
ccagttagcagctcggcagggcagggagaagacgcaacttcagctcctccagaaacctggggagggccaggagt
gggaagaagggggggatcggagggttaagggcacaggccctcttatcctcttaaaatctggtcagagctctgccctc
10 cctccctactctgtccactcataatttcagatggagttgggggcttaggagtggaaccaacacaacctaccctgcaata
aaccaaccttcttctgcttctggttctgggtgaaaaatggnaaaagaaatctcccaagtgaagtgtaaacancntcctg
ggttggaatgggatctgaagagtactaagatccctcagacctggaattccaccatttagtcttccctctctccaaagtctc
aatgtgcaaaagatcctcttcagtttcagagcaatgataggatcttctaaaaggagacaaaagccaaggtgcaggaaaa
atagaattcagttcttcacccaaaggcagcctgtcctgggagacaggggtgaaacacttggtcctgatctccatcagagga
15 tccagagtggtgtgtgttgggtgctggggagggggacacaatatagagcatctggtgactcaaagtatgtgcctccagagt
agcatcaatcaatgttacctggaagctttagaaatgcagaatttcaggcttcacctcagaccactgaatcagaaactgc
atcttaacaagatccctcatgattcatagcacattaaattggagaagcgtgacctgagaccctcctcctctctgcttggg
cccatagttctacctttattgtcacctcgtctcacctcgtgctcataccccaggctttagcctacccttcccccatggggaa
aggacacaaggccaccagccccctcacttcctaccaggacctggccctcctctgggactggagaaggacaaaagagga
20 cccctctgtggaggtctacgacctctcctgaccaagtagtccactcaccacaagtggctctacctctctgagtctcagttc
cacatccacaaaagggtggcaatgctatctgccaccagaaatggctgtgaggggtggagcaggcgaagcctctgtgcat
cagagaaattgtgtctcttttctatttctccagtggttcttctcgtcttattcttttttttttttctgtctgttatttttag
ggcctgtcctgtggcatacgggaagtcccagggtaggggtccaatgggagctgtagccccgggcctacgccacagcca
cagcaatgtgggatctgagccacgtctgcaacctacaccacagctcacggcaacaccagatccttaaccactgagcaa
25 ggccagggtatcgagccacgtcctcatggatgctagtgggttcgttaaccgctgagccaatgatataactcctcttctatt
ctttagtcacaaacagtcaacaaagggtgctgaccaaggctgacgtgcccacccccagccccagactgggccagt
ggccaccccttgggtctctctggaatcctgccagcatcaattggctccactctccaggaggatgggaagccctgtggc
ccctgggactcacacccctctgcatctcccagagtgcaggacctggtcttcaggagacaccaagaactggctccccgg
ctctgtgccccacccccctactaccagtttctctccattctgccagtcaggccccctgggggttactctcctctctctgt
30 acaccagtgaacctcagaacctgttccctcctgggaacaccactaccacgtgggagaaggggtcgtctaggggttg

ggccccagatacacttgtaagcaggaacacacgagcccttacatgtgggtgtcccggaagaagggggtttccaccccc
 cgcttagtcaccctgcccctctgcagctgcctgagccaccaagaccagccaaggtctctgccttctggcctgagggc
 cagctccccatcctgaaaaacctgtctggggcctccctgaggtgtagggcccaaggcctccctgaggtgtaggg
 cccaaggggcaggttgaacaggattccctctgcccctcctacccccaggacaaaaccagagccccaggacagggc
 5 ctcacttgccctcaggaaaccacagcttgccagcaccagcccagcaccagcccagct

또한 본 발명의 돼지 유로플라킨 II 프로모터는 상기 서열번호 1
 의 염기서열에 하나 이상의 붕괴(disruption), 결실(deletion), 삽입(insertion),
 점(point), 치환(substitution), 논센스(nonsense), 미스센스(misense), 다형현상
 10 (polymorphism), 재배열 돌연변이(mutation)가 일어난 기능적 등가물 중 선
 택된 하나가 될 수 있다.

본 발명은 상기 프로모터의 전체 또는 일부를 포함하는 것을 특징
 으로 하는 발현벡터를 함께 제공한다.

본 발명의 발현 벡터는 구체적으로 상기 프로모터를 포함하며, 그
 15 3' 쪽으로 목적단백질을 암호화하는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로
 한다.

또한 본 발명은 상기 발현 벡터를 동물의 수정란에 도입하고, 상기
 수정란을 이용하여 형질전환시킨 동물을 제공한다.

또한 본 발명은 형질전환동물로부터 소변을 수거하여, 발현된 목적
 20 단백질을 분리·정제하는 방법으로 이루어진 유용단백질의 대량생산방법
 을 함께 제공한다.

본 발명의 프로모터는 돼지의 유로플라킨 II 구조유전자의 5' 쪽에
 위치하여 유로플라킨 II 구조유전자의 발현을 조절한다.

본 발명의 프로모터는 돼지의 게놈 라이브러리(genome library)를 스
 25 크리닝(screening)하여 분리할 수 있으며, 그 분리 방법은 다음과 같다.

우선 스크리닝의 프로브로 사용될 돼지 유로플라킨 II 유전자의
 염기서열 일부를 얻기 위해, 염기서열이 공지된 다른 동물들의 유로플라킨
 II 염기서열을 비교하여 종 간에 잘 보존된 부분을 바탕으로 프라이머를
 제작하고(정방향 프라이머: 서열번호 2, 역방향 프라이머: 서열번호 3), 돼
 30 지 방광의 전체 RNA(total RNA)를 주형으로 하여 RT-PCR을 수행한다.

RT-PCR을 통해 유로플라킨 II 염기서열의 일부를 얻은 후, 이를 프로브로 하여 돼지의 게놈 라이브러리를 스크리닝한다. 본 발명에서 사용한 프로브는 도 2에 나타난 바와 같이, 유로플라킨 II 구조유전자의 2번 엑손부터 5번 엑손에 걸치는 부분을 포함하는 프로브 A, 그리고 1번 엑손부터 2번 엑손에 걸치는 부분을 포함하는 프로브 B의 두 종류이다.

라이브러리 스크리닝 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 유로플라킨 II 구조유전자 또는 프로모터 부분을 포함하는 클론들을 얻고, 이들의 염기서열을 비교하여 프로모터의 염기서열을 최종적으로 결정하여, 돼지 유로플라킨 II 프로모터의 완전한 염기서열을 얻는다.

10 이렇게 하여 얻은 프로모터는 총 8847bp의 크기를 가지며, 그 염기서열에 있어서 세포에서 항상 일정하게 발현되는 유전자(housekeeping gene)의 특징인 높은 G/C 함량을 나타내며, AP2 및 GATA 박스 등의 다양한 Sp1 엘레먼트(element)를 포함한다.

본 발명의 프로모터는 돼지의 여러 신체 조직 중 방광조직에서만 특이적으로 단백질을 발현시킨다. 돼지 유로플라킨 II의 경우, 전체 방광 세포의 8~14% 정도에서 발현되며, 특히 방광상피 상부기저세포(urothelial suprabasal cell) 중 활발하게 증식하며 세포분열 중인 우산세포(umbrella cell)에서 높은 발현율을 나타낸다.

20 이처럼 본 발명의 프로모터는 높은 효율로 단백질의 방광 특이적 발현을 유도하므로, 본 발명의 프로모터를 이용하면 방광특이적으로 외부에서 유래한 목적단백질을 발현하는 발현 벡터를 제조할 수 있다.

본 발명의 발현 벡터를 제조할 때는, 단백질 발현에 사용되는 기존의 벡터를 기본 골격으로 하여, 본 발명의 프로모터를 삽입하고, 그 3' 쪽으로 목적단백질을 암호화하는 염기서열을 삽입함으로써 제조한다.

25 본 발명의 발현 벡터에서, 기본 골격으로 사용되는 벡터는 일반적으로 사용되는 발현벡터 중 적절한 하나를 선택하여 사용할 수 있으며, 그 예로 다양한 클로닝 부위를 가진 pBluescript SK 계열의 벡터를 비롯하여, pLNCX 등의 리트로바이러스 벡터(retroviral vector) 등을 들 수 있다.

본 발명의 발현 벡터는, 의약품의 유효성분으로서 사용되는 모든 30 단백질, 즉 EPO(erythropoietin), 알도스테론(aldosterone), 아드레노코르티코트로

핀(adreno-corticotropin), 혈액응고인자(blood clotting factor), 고나도트로핀(gonado-tropin), 인슐린(insulin), 프로락틴(prolactin) 또는 바소프레신(vasopressin) 등을 발현시킬 수 있다.

또한 본 발명의 발현 벡터는 필요에 따라 조절인자들, 즉 또다른
5 프로모터, 인핸서(enhancer), 선택적 표지 유전자(selective marker), 5'-UTR(untranslated region), 3'-UTR, 폴리아데닐화 신호(polyadenylation signal), 리보솜 결합 서열, 게놈의 특정 부위로 삽입될 수 있는 염기서열, 또는 인트론을 적절한 위치에 추가로 포함할 수 있다.

본 발명은 유로플라킨 II 프로모터를 포함하는 발현 벡터의 바람
10 직한 예로, 돼지 유로플라킨 II 프로모터의 조절 하에 인간 EPO를 발현할 수 있는 발현 벡터 pUP2/hEPO를 제공한다(도 3).

본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO는 pBluescript SK(-) 벡터를 기본 골격으로 사용하며, 본 발명의 유로플라킨 II 프로모터의 3' 쪽에 인간 EPO를 암호화하는 유전자(Lin F. K. et al, Proc. Natl. Acad. Sci, USA, Cloning
15 and expression of the human erythropoietin gene, 82:7580-7584, 1985, 서열번호 4)가 융합되어 있다. 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO는 2002년 10월 17일 한국 생명공학연구원 유전자은행에 기탁번호 KCTC 10352BP로 기탁하였다.

본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO는 필요에 따라 네오마이신 저항성 유전자(neomycin-resistant gene), 인슐레이터(insulator), 또는
20 WPRE(woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) 등을 추가로 포함함으로써, 형질전환 세포주의 구축을 용이하게 하며, 목적단백질 발현량의 극대화 및 발현의 안정성을 도모할 수 있다.

네오마이신 저항성 유전자는 세포주 구축시 사용되는 G418 시약에 대해 저항성을 나타내는 유전자로, PII 프로모터의 조절 하에 단백질을 발
25 현하는 동물세포주(animal cell line) 구축시 효율적인 선택적 표지 유전자로서 작용할 수 있다. 네오마이신 저항성 유전자의 염기서열은 다음과 같다(서열번호 5).

gcggccgcgcgcgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatttggttatttttctaaataca
ttcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaagggaagagtcctgaggcggaa
30 agaaccagctgtggaatgtgtgtcagttagggtgtggaaagtccccaggctccccagcaggcagaagtatgcaaagcat

gcatctcaattagtcagcaaccagggtgtgaaagtccccagggtccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctc
 aattagtcagcaaccatagtcgcccccctaactccgcccatcccgccctaactccgccaggtccgccattctccgcc
 catggctgactaatTTTTTattatgcagaggccgaggccgcctcggcctctgagctattccagaagttagaggaggctt
 tttggaggcctaggcttttgcaaagatcgatcaagagacaggatgaggatcgttcgcattgaacaagatggattgca
 5 cgcagggttctccggcgcttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacacagacaatcggctgctctgatgccg
 ccgtgtccggctgtcagcgcagggggcgccgggtcttttgcgaagaccgacctgtccgggtgccctgaatgaactgcaag
 acgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacggcggttccttgcgcagctgtgctcgacgtgtcactgaagcgg
 gaagggactggctgctattggcgaaagtccggggcaggatctcctgtcatctcaccttgcctcctgccgagaaagtatcc
 atcatggctgatgcaatcgggcggtgcatacgttgatccggctacctgccattcgaccaccaagcgaaacatcgcat
 10 cgagcgagcacgtactcggatggaagccggcttctgcatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgcc
 agccgaactgttcgccaggctcaaggcgagcatccccgacggcgaggatctcgtcgtgacctatggcgatgcctgcttg
 ccgaatatcatggtggaaaaatggccgcttttctggattcatcactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatcaggac
 atagcgttggctacccgtgatattgctgaagagcttggcggcgaaatgggtgaccgcttcctcgtgctttacgggtatcgccg
 ctcccgattcgcagcgcattcctctatgccttcttgacgagtcttctgagcgggactctgggggttcgaaatgaccgac
 15 caagcgacgcccacctgccatcacgagatttcgattccaccgccgcttctatgaaagggtggggttcggaatcgttttc
 gggacgccggctggatgatcctccagcgcggggatctcatgctggagtcttcgccaccctagggggaggctaactga
 aacacggaaggagacaataccggaagggaaccgcgctatgacggcaataaaaagacagaataaaacgcacgggtgtg
 ggtcgttgttcataaacgcgggggttcgggtccagggtggcactctgtcgataccccaccgagacccattggggccaa
 tacgcccgcgttcttcttttccccacccaccccccaagttcgggtgaaggcccagggtcgcagccaacgtcggggc
 20 ggcaggccctgccatagcctcagggttactcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctagggtga
 agatccttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgtccactgagcgtccgatcg

인슐레이터는 프로모터 부근에 존재하는 조절인자의 영향을 돕고,
 위치 비의존적인 (position-independent) 발현을 도와주는 인자로, UPII 프로
 25 모터의 조절 하에 단백질을 안정적으로 발현할 수 있게 한다. 인슐레이터
 의 염기서열은 다음과 같다(서열번호 6).

tcgactctagaggacagccccccccaaagccccagggtgtaattacgtccctccccgctaggggca
 gcagcgagccgcccggggtccgctccggctccggcgctccccgcacccccgagccggcagcgtcggggacag
 cccgggcacggggaagggtggcacgggatcgtttcctctgaacgtttctcgtgctctttgagcctgcagacacctgggg
 30 ggatacggggaaaaagctttaggctgaaagagagattagaatgacagaatcatagaacggcctgggttgcaaggagc

acagtgtcatccagatccaacccctgctatgtgcagggtcatcaaccagcagcccaggctgcccagagccacatcca
 gcctggccttgaaatgcctgcagggatggggcatccacagcctccttgggcaacctgttcagtgcgtcaccacccctctggg
 ggaaaaactgcctcctcatatccaacccaaacctcccctgtctcagtgtaaagccattccccctgtcctatcaagggggag
 tttgctgtgacattgttggtctgggtgacacatgtttgccaattcagtgcacacggagaggcagatcttggggataagga
 5 agtgcaggacagcatggacgtggacatgcagggtgttgagggtctgggacacttccaagtcacagcgttcagaaca
 gccttaaggataagaagataggatagaaggacaaagagcaagttaaaaccagcatggagaggagcacaaaaaggcc
 acagacactgcttggtccctgtgtctgagcctgcatgtttgatgggtgtctggatgcaagcagaaggggtggaagagcttggc
 tggagagatacagctgggtcagtaggactgggacaggcagctggagaattgccatgtagatgttcatacaatcgtcaaat
 catgaaggctggaaagcctccaagatccccaagaccaaccccaacccacccaccgtgcccactggccatgtccctcagt
 10 gccacatccccacagttcttcatcacctccaggacgggtgacccccccacctccgtgggcagctgtgccactgcagcac
 cgctctttggagaaggtaaatcttgctaaatccagccgacctcccctggcacaacgtaaggccattatcttcatccaac
 tccaggacggagtcagtggatggggctctagaggacagccccccccaaagccccagggatgtaattacgtccc
 tccccgctagggggcagcagcagccgcccggggctccgctccgggtccggcgtccccccgcatccccgagccggc
 agcgtgccccggacagccccgggcacggggaaggtggcacgggacgctttccttgaacgcttctcgtgctctttgagc
 15 ctgcagacacctggggggatacggggaaaaagccttaggctgaaagagagatttagaatgacagaatcatagaacggc
 ctgggttgcaaaggagcacagtgtcatccagatccaacccctgctatgtgcagggtcatcaaccagcagcccaggct
 gcccagagccacatccagcctggccttgaaatgcctgcagggatggggcatccacagcctccttgggcaacctgttcagt
 gcgtcaccaccctctgggggaaaaactgcctcctcatatccaacccaaacctcccctgtctcagtgtaaagccattccccct
 tgtcctatcaagggggagtttctgtgacattgttggtctgggtgacacatgtttgccaattcagtgcacacggagaggc
 20 agatcttggggataagggaagtgcaggacagcatggacgtgggacatgcagggtgttgagggtcttgggacacttccaa
 gtcacagcgttcagaacagccttaaggataagaagataggatagaaggacaaagagcaagttaaaaccagcatggag
 aggagcacaaaaaggccacagacactgctggtccctgtgtctgagcctgcatgtttgatggtgtctggatgcaagcagaa
 ggggtccatgtccctcagtgccacatccccacagttcttcatcacctccaggacgggtgacccccccacctccgtgggca
 gctgtgccactgcagcaccgctctttggagaaggtaaatcttgctaaatccagccgacctcccctggcacaacgtaag
 25 gccattatcttcatccaactccaggaacggagtcagtgag

WPRE는 mRNA의 안정화에 기여하여 단백질 합성량을 증대시킬
 수 있는 조절인자로, UPII 프로모터의 조절 하에 단백질을 대량으로 발현
 할 수 있게 한다. WPRE의 염기서열은 다음과 같다(서열번호 7).

30 accaggttctgtcctgttaataaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggattcttaactatgttgct

11

그 예로, 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO로 형질전환된 생쥐의 경우, 0.5~1mg/ml 수준의 높은 EPO 발현율을 나타낸다. 원래 EPO는 태아의 조기 사망을 유발하기 때문에 발현시키기 어려운 단백질임에도 불구하고, 기존의 유로플라킨 프로모터를 이용한 소변 중 단백질 발현율에 비해
5 1000배 이상의 높은 발현율을 나타낸다.

또한 본 발명의 형질전환동물로부터 생산된 단백질은 시판되는 동물 단백질이 나타내는 것 이상의 우수한 생리활성을 나타낸다.

그 예로, 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO로 형질전환된 생쥐로부터 얻은 EPO는, EPO 의존성 세포인 간세포주(hepatocyte cell line)의 생존율
10 을 시판되는 EPO보다 높은 수준으로 유지시킨다.

따라서 본 발명의 프로모터, 이를 이용한 발현 벡터 및 형질전환동물은 그간 대량생산하기가 어려웠던 유용단백질의 생산 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

15 [도면의 간단한 설명]

도 1은 본 발명의 돼지 유로플라킨 II 프로모터를 분리하는데 사용된 프로브와, 상기 프로브에 의해 분리된 클론들의 구조를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO의 구조를 나타낸 도이다.

20 도 3은 돼지 유로플라킨 II mRNA의 방광 특이적 발현을 나타낸 도이다.

도 4는 돼지 유로플라킨 II 단백질의 방광상피 특이적 발현을 나타낸 도이다.

25 도 5는 돼지 유로플라킨 II 단백질의 방광세포 중 발현을 및 우산 세포 특이적 발현을 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO로 형질전환된 생쥐에서 EPO mRNA의 방광 특이적 발현을 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO로 형질전환된 생쥐에서 EPO 단백질의 발현을 나타낸 도이다.

30 도 8은 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO의 구조를 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO의 구조를 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO의 구조를 나타낸 도이다.

도 11은 본 발명의 발현 벡터들의 EPO 유전자 발현량을 비교하여 나타낸 도이다.

5 도 12는 본 발명의 발현 벡터들의 EPO 단백질 발현량을 비교하여 나타낸 도이다.

[실시예]

이하 본 발명을 하기 실시예에서 보다 상세하게 설명하되, 실시예
10 에 의해 본 발명의 범위가 국한되는 것은 아니다.

<실시예 1> 본 발명의 돼지 유로플라킨 II 프로모터의 분리

본 발명의 돼지 유로플라킨 II 프로모터를 분리하기 위해, 다음과
같이 실험을 수행하였다.

15

1) RT-PCR(Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction)에 의
한 프로브 준비

돼지의 유로플라킨 II 유전자의 염기서열이 공지되지 않았기 때문
에, 염기서열이 공지된 생쥐와 소의 유로플라킨 II cDNA를 비교하여 두
20 종 간에 높은 상동성을 나타내면서 보존된 부분을 참조하여, 돼지 유로플
라킨 II cDNA의 증폭에 사용될 디제너레이트 프라이머(degenerate primer)
를 제조하였다. 정방향 프라이머의 염기서열은 서열번호 2, 역방향 프라이
머의 염기서열은 서열번호 3에 각각 나타나 있다.

상기 프라이머를 이용하여, 돼지 방광의 전체 RNA(total RNA)에 대
25 해 MuMLV 역전사효소를 사용하여 RT 반응을 수행하고, 그 결과 얻은
cDNA에 대해 Taq 중합효소를 사용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 DNA
는 염기서열 판독 결과, 유로플라킨 II의 구조유전자 일부인 것으로 확인
되었으며, pGEM T-easy 벡터를 사용하여 클로닝하였다.

유로플라킨 II 프로모터를 분리하는데 사용될 프로브를 제조하기
30 위해, 상기에서 클로닝한 DNA 50ng을 3분간 끓인 후, 얼음에서 식혀 변성

(denature)시켰다. 변성된 DNA를 프라이머, dNTP, [α - 32 P]dCTP(3000 Ci/nmol, NEN)를 함유하는 반응 완충액에 첨가한 후, 클레노우 효소(Klenow fragment)를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 이렇게 하여 제조된 프로브는 유로플라킨 II 구조유전자의 2번 엑손부터 5번 엑손에 걸치는 부분을 포함하는 프로브 A, 그리고 1번 엑손부터 2번 엑손에 걸치는 부분을 포함하는 프로브 B의 두 종류이다(도 1).

이후 반응액을 세파덱스 컬럼(Sephadex G-50 column)을 사용하여 정제함으로써, 32 P로 표지된 돼지 유로플라킨 II 프로모터 탐지용 DNA 프로브 A 및 프로브 B를 준비하였다.

10

2) 라이브러리 스크리닝(Library Screening)

돼지 유로플라킨 II 프로모터를 분리하기 위해, 돼지의 게놈 라이브러리를 스크리닝하였다. 본 실시예에서 돼지의 게놈 라이브러리는 람다 픽스 II 파지 벡터(lambda Fix II phage vector, Stratagene)에 삽입된 것을 사용하였다.

15

라이브러리를 도입할 호스트 박테리아는 다음과 같이 준비하였다.

0.2%의 말토오스(maltose)가 함유된 LB 배지 5ml에 박테리아 콜로니 하나를 접종하여 37℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 상기 배양액의 1%를 다시 새로운 0.2%의 말토오스 함유 LB 배지 50ml로 옮겨, 2.5시간 동안 배양하였다. 600nm에서의 흡광도가 0.5 정도 되었을 때, 배양액을 2500rpm의 속도로 10분간 원심분리하였다. 그 결과 얻은 세포 침전물을 멸균한 10ml 황산마그네슘 용액에 현탁시켜, 최종농도가 1×10^{10} 세포/ml이 되도록 하고, 실험할 때까지 4℃에 보관하였다.

20

라이브러리를 적정(titration)하기 위해, 라이브러리를 SM 용액에 여러 농도로 연속 희석(serial dilution)하였다. 고체 LB 배지가 담긴 플레이트(plate)를 37℃ 항온반응기(incubator)에서 데우고, 탑 아가(top agar)를 녹여 48℃로 유지되는 수조에 놓아두었다. 여러 농도로 희석된 파지 용액 10 μ l와 상기에서 준비한 호스트 박테리아 100 μ l를 혼합하여, 37℃에서 호스트 박테리아를 감염(infection)시켰다.

30 탑 아가에 파지로 감염된 호스트 박테리아를 첨가하고 잘 흔들어

준 후, 상기에서 준비해 둔 LB 배지 위에 부었다. 15분 후 플레이트를 거꾸로 뒤집어 37℃ 항온반응기에서 하룻밤 동안 배양하였다. 밤새 배양한 플레이트의 배지 상에서는 파지가 호스트 박테리아 내에서 라이브러리 DNA를 복제한 후 호스트 박테리아를 용해시킨 흔적인 플라그가 형성되었으며, 이후의 실험 단계를 위해 배지를 4℃에서 1시간 이상 식혔다.

상기 플레이트에 대해, 일련 번호를 기재한 NC 필터를 준비하고, 필터의 가운데 부분부터 당도록 하여 상기에서 준비한 라이브러리 DNA 플레이트 위에 필터를 덮었다. 필터에 바늘을 수직으로 찔러 위치를 표시하고, 1분 후 조심스럽게 필터를 배지로부터 떼어냈다.

각 필터를 변성화 용액(denaturation solution), 중성화 용액(neutralization solution) 및 2 × SSC 용액에 차례로 1분씩 담근 후, 80℃ 오븐에서 2시간 동안 두어, 전이된 라이브러리 DNA가 필터 상에 완전히 고정(immobilization)되도록 하였다.

고정된 필터를 2 × SSC 용액 상에 띄워 적신 후, 전혼성화 용액(prehybridization solution)이 들어 있는 페트리 디시(petri dish)에 하나씩 담그고, 68℃에서 1시간 동안 살살 흔들어 주면서 전혼성화 반응을 수행하였다. 전혼성화 반응 후, 상기 실시예 1의 1)에서 준비한 프로브를 첨가하고, 68℃에서 18시간 동안 살살 흔들어 혼성화 반응을 수행하였다. 혼성화 반응 후, 0.1% SDS를 함유하는 2 × SSC 용액에 필터를 담그고, 65℃에서 10분 동안 흔들면서 세척하는 과정을 2번 반복하였다. 세척 후, 필터를 공기 중에서 건조시키고, 자기방사기록법(autoradiography)을 수행하였다.

자기방사기록과 플레이트를 대조하여, 양성 반응을 보이는 플라그를 선택하고, 플라그를 SM 완충액 500μl에 넣고 클로로포름(chloroform)한 방울을 첨가한 후 잘 섞어 4℃에 보관하였다. 상기와 같은 스크리닝 과정을 세번 반복하여, 양성반응을 나타내는 클론들을 최종적으로 얻었다. 각 클론이 함유하는 DNA는 정제 키트(Qiagen lambda mini kit)를 이용하여 정제하였다.

DNA 염기서열의 판독은 ABI 377 DNA sequencer(Applied Biosystem)을 이용하였으며, 서열판독결과는 CAP2 sequence assembly system을 사용하여 처리하고, 서열비교는 BLAST, SMART, PROSITE 등을, 그리고 모티프

(motif) 분석은 Clustal W 프로그램을 사용하였다.

그 결과 프로브 A를 사용하여 스크리닝한 경우, 도 1의 클론 A 및 클론 B를 얻었으며, 프로브 B를 사용하여 스크리닝한 경우, 도 1의 클론 C 및 클론 D를 얻었다. 이들 클론은 각각 돼지 유로플라킨 II 프로모터 또는 그 3' 방향으로 구조유전자를 포함하고 있으므로, 이들을 비교하여 돼지 유로플라킨 II 프로모터의 완전한 염기서열을 얻었다.

본 발명의 돼지 유로플라킨 II 프로모터는 총 8847bp의 크기로, 그 염기서열은 서열번호 1에 나타나 있다.

10 3) 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질의 발현 양상 확인

본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질의 발현 양상을 확인하기 위해, 돼지 유로플라킨 II의 발현을 다음과 같이 확인하였다.

15 3-1) 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질의 방광 특이적 발현 확인

본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질이 방광 특이적으로 발현됨을 노던 분석(Northern analysis)을 통해 확인하였다.

상기 실시예 1의 2)에서 얻은 돼지 유로플라킨 II cDNA를 프로브로 하였으며, 이때 대조군으로 모든 조직에서 일정하게 발현되는 액틴에 대한 프로브도 준비하였다. 상기 프로브들을 사용하여 여러 종류의 돼지 신체 조직에서 돼지 유로플라킨 II mRNA의 발현을 확인하기 위해, 방광, 심장, 간, 신장, 폐, 자궁 및 지라 등 의 조직에 대한 전체 RNA에 대해 다음과 같이 전기영동을 수행하였다.

25 아가로스(agarose) 0.7g을 250ml 용량의 삼각 플라스크에 넣고 증류수 58 ml를 첨가하여, 전자레인지에서 완전히 녹인 후 60℃로 유지되는 항온 수조에서 식혔다. 아가로스 겔의 온도가 60℃ 정도로 맞춰졌을 때, 10 × 이동완충용액(running buffer) 7ml를 조심스럽게 흔들면서 첨가하고, 추가로 11.9ml의 포름알데히드(formaldehyde)를 첨가하여 1 × 포름알데히드 이
30 동 겔 용액을 준비하였다. 미리 설치된 전기영동기구에 상기 용액을 붓고

20분 정도 방치하여 겔을 제조하였다.

미세원침관에 RNA $6\mu\text{l}$, $10 \times$ 이동완충용액 $2.5\mu\text{l}$, 포름알데히드 $4\mu\text{l}$, 포름아미드(formamide) $12.5\mu\text{l}$ 를 잘 혼합하여, 65°C 에서 5분간 가열한 후 얼음 속에서 냉각시켰다. 상기 시료에 겔 로딩 완충용액(gel-loading buffer) $2.5\mu\text{l}$ 를 첨가하여 잘 혼합한 후, 50 V로 약 5분간 미리 전기영동시킨 겔에 로딩하여 $1 \times$ 이동완충용액에서 120 V/cm 로 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후, 0.05 N 수산화나트륨 용액에 겔을 약 10분 정도 담가두어, 이후의 전이과정에서의 효율이 증진되도록 RNA를 부분 절단하였다.

겔을 pH 7.5의 0.1 M 트리스 용액에 30분간 담가두고, 다시 $20 \times$ SSC 용액(3M 염화나트륨, 0.3M 염화시트레이트(sodium-citrate), pH 7.3)에 약 30분 가량 담가둔 후, 양이온으로 하전된 멤브레인을 이용하여 RNA를 전이시켰다. 전이가 끝난 멤브레인은 RNA 고정을 위해 80°C 에서 2시간 동안 두었다.

멤브레인을 비닐 백에 넣고 멤브레인이 완전히 잠길 수 있는 최소 부피의 혼성화용액을 담은 후, 68°C 의 진동 항온반응기에서(shaking incubator)에 1시간 이상 보관하였다. 이후, 용액을 빼내고 프로브가 함유된 혼성화용액 15ml로 교체하여 68°C 의 진동 항온반응기에서 하룻밤 동안 방치하였다.

혼성화 후, 상온에서 세척용액 $1(2 \times \text{SSC}, 0.1\% \text{SDS})$ 을 교체해가며 30분간 멤브레인을 세척하고, 이후 55°C 에서 세척용액 $2(0.2 \times \text{SSC}, 0.1\% \text{SDS})$ 을 교체해가며 30분간 멤브레인을 세척하였다. 멤브레인을 상온에서 완전히 건조시킨 후, 자기방사기록법(autoradiography)을 수행하여 돼지 유로플라킨 II mRNA의 발현 여부를 비교하고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

도 3a에 나타난 바와 같이 대조군인 액틴 mRNA는 모든 조직에서 고르게 발현된 반면, 도 3b에 나타난 바와 같이 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 유로플라킨 II mRNA는 돼지의 방광에서만 특이적으로 발현되었다(도 4b).

따라서, 본 발명의 프로모터는 방광 특이적으로 단백질을 발현시킬 수 있다.

3-2) 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질의 방광상피 특이적 발현 확인

한편 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질이 방광 조직 중 어느 세포에서 발현되는지를 확인하기 위해, 다음과 같이 면역조직 염색을 수행하였다.

돼지 방광 조직의 파라핀 절편을 준비하여, 히스토클리어 (Histo-clear) 용액에 약 10분 동안 담가 파라핀을 제거하였다. 절편을 점차 적으로 농도를 감소시키면서 알콜 수용액에 담가 탈수시킨 후, 3% 과산화 수소수를 함유하는 메탄올 및 0.1% 펩신을 함유하는 0.05N 염산(pH 2.25) 용액에 30분 동안 담가두어, 비특이적으로 염색되는 것을 미리 방지하였다.

상기 절편을 TBS 완충액(0.05 M 트리스, pH 7.4, 0.85% 염화나트륨)을 이용하여 5분간 두번씩 세척한 후, 1:5의 비율로 일반 말 혈청을 희석한 TBS에서 블로킹(blocking) 반응을 수행하였다.

블로킹된 절편은 1:500의 비율로 1차 항체를 희석한 TBS에 하룻밤 동안 담가두었다. 이때 1차 항체로 돼지 유로플라킨 II 단백질에 특이적으로 결합할 수 있도록 제조된 다중클론항체(polyclonal antibody)를 사용하였으며, 음성 대조군으로 ABC 키트의 말혈청 1방울을 사용하였다.

1차 항체 반응을 수행한 절편을 TBS로 5분씩 2번 세척하여 과량의 항체를 제거한 후, 바이오틴(biotin)이 부착된 2차 항체와 30분간 반응시켰다. 이후 절편을 TBS로 5분간 3번 세척한 후, ABC 시약과 30분간 반응시켰다. 다시 절편을 TBS로 세척하고, 1% 트리톤(Triton)-X 100을 함유하는 PBS로 30초 헹구어 준 후, 0.5% DAB(diaminobenzidine) 및 0.01% 과산화수소를 함유하는 0.05M 트리스 완충액(pH 7.6)과 반응시켜 발색 반응을 수행하였다.

발색 반응 후, 절편을 물로 세척하고 탈수시키고 마운팅한 후, 광학현미경 하에서 발색된 부분을 관찰하여 그 결과를 도 4에 나타내었다.

도 4a의 대조군에서는 어떠한 양성반응도 나타나지 않았으나, 도 4b에서 방광조직에 유로플라킨 II 단백질에 대한 항체를 반응시킨 결과, 본 발명의 프로모터는 유로플라킨 II 단백질을 돼지 방광상피에서만, 특히

상부기저세포의 세포질에서 특이적으로 발현되도록 조절하는 것으로 나타났다.

3-3) 본 발명의 프로모터 조절 하에 발현되는 단백질의 발현을 확

5 인

방광상피세포는 단백질 합성이 활발하게 일어나는 유선조직에 비해 상대적으로 단백질 합성 능력이 낮은 것으로 알려져 있으므로, 본 발명의 프로모터 조절 하에 발현되는 단백질의 실제 발현 수준을 레이저 스캐닝 세포분석(Laser scanning cytometry: 이하 'LSC'라 한다)을 통해 다음과 같
10 이 확인하였다.

돼지 방광조직을 잘게 찢어, 1mg/ml 콜라게나제 타입 I (collagenase type I, Sigma), 0.51 mg/ml 히알루로니다제(hyaluronidase, Sigma), 50 μ g/ml 겐타마이신(gentamicin)을 함유하는 DMEM/F12 배지(Gibco)에 첨가하고 37 $^{\circ}$ C
에서 1시간 동안 분해반응을 수행하였다.

15 PBS로 세척한 후, 60 μ m 나일론 망(Milipore)을 사용하여 큰 덩어리를 걸러내고, 현탁된 단일 세포들을 0.1% 젤라틴으로 코팅된 Lab-Tek চে임버 슬라이드(Nunc)에 부착시켰다. 슬라이드에 부착된 세포들을 차가운 PBS로 세척한 후, 차가운 메탄올로 15분간 고정시키고, 0.1% 트리톤-X 100 용액에 10분간 처리하였다.

20 고정된 세포들을 1% BSA를 함유하는 PBS 용액에서 1시간 동안 블로킹시키고, 상기 실시예 1의 3-2)에서 제조한 유로플라킨 II 다중클론항체를 1:100으로 희석한 용액에서 2시간 동안 실온반응시켰다. 세포들을 PBS로 세척한 후, FITC가 부착된 항-생쥐 IgG 2차 항체(Cappel Laboratories)와 반응시켰다. 이때, 음성대조군으로서 2차 항체만 반응시킨 군도 함께
25 준비하였다.

0.1% 트윈-20을 함유하는 PBS로 3번 세척한 후, 전체 세포수를 측정할 수 있도록 50 μ g/ml PI(propidium iodide)로 염색하였다. LSC 분석시 488 nm의 아르곤 레이저로 형광을 방출시키고, FITC의 경우 530nm에서, PI의 경우 570nm 필터를 이용하여 각각의 형광 발현을 관찰하고 그 결과를 도 5
30 에 나타내었다. 음성대조군에 대한 분석결과는 도 5a, 방광 세포 중 유로

플라킨 II를 발현하는 세포에 대한 분석결과는 도 5b, 유로플라킨 II를 발현하는 방광세포의 면역표현형 분석은 도 5c에 각각 나타내었다.

도 5b에 나타난 바와 같이, 전체 방광세포의 8~14% 정도가 유로플라킨 II를 발현하였으며, 도 5c에서 이들은 대부분 활발히 증식하고 분열하는 중인 우산세포임을 확인하였다. 일반적으로 소변 내의 단백질이 보통 5~25mg/l 의 매우 낮은 수준임을 감안할 때, 상기와 같은 수준의 유로플라킨 II 발현율은 상당히 높은 것이며, 유선 조직을 이용했을 때보다 더 높은 효율로 단백질을 분리·정제할 수 있도록 할 것으로 추정된다.

따라서, 본 발명의 프로모터는 방광 내에서 우수한 효율로 목적단백질이 발현되도록 함을 알 수 있다.

<실시예 2> 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO의 제조

상기 실시예 1에서 분리한 본 발명의 프로모터를 이용하여, 상기 프로모터의 조절 하에 EPO를 발현하는 벡터를 다음과 같이 제조하였다.

기본 골격 벡터로 pBluescript SK(-) 벡터를 정하여, 상기 실시예 1의 2)에서 분리한 본 발명의 프로모터를 삽입하였다. 그후 프로모터의 3' 쪽에 인간 EPO를 암호화하는 유전자(서열번호 4)를 삽입하였다.

그 결과 얻은 본 발명의 발현 벡터의 구조는 도 2에 나타나 있으며, 본 발명의 유로플라킨 II 프로모터의 조절 하에 EPO를 발현하게 된다. 상기 벡터를 pUP2/hEPO으로 명명하고, 2002년 10월 17일 한국 생명공학연구원 유전자은행에 기탁번호 KCTC 10352BP로 기탁하였다.

<실시예 3> 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO를 도입한 수정란의 제조

상기 실시예 2에서 제조한 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO를 도입한 수정란을 다음과 같이 제조하였다.

1) 수정란의 채취

수정란을 채취하기 3일 전에 암컷 생쥐의 복강 내에 PMSG를 투여하고, 2일 후 오후 5시에 hCG를 투여한 후, 수컷 생쥐와 교배시켰다. 교배

다음날 오전 중에 암컷 생쥐에서 플러그(plug)가 생성되었는지를 관찰하여 임신 여부를 확인하였다.

임신한 것으로 확인된 생쥐를 경추탈골시킨 후, 외과용 가위로 개복하여 자궁의 결합조직부분을 분리하였다. 난관과 자궁 사이를 핀셋으로
5 찢은 후, 난소와 난관 사이를 가위로 자르고, 핀셋으로 찢은 부분의 자궁 쪽을 잘라 난관을 분리하였다.

분리한 난관을 M2 배지에 넣어 보온판 위에 올려놓고, 온도가 내려가는 것을 방지하였다. 1ml 바늘을 이용하여 현미경 하에서 난관 팽대부를 터뜨려 배아(embryo)를 회수하였다. 회수한 배아를 미리 실온에 꺼내둔
10 히알루로니다제 용액에 넣고, 난구세포가 떨어질 때까지 방치하였다.

M2 배지로 2~3 차례 세척한 후, 13000rpm에서 5분간 원심분리하고, 다시 M2 배지로 2~3 차례 세척하여 정상란을 선별하였다. 선별된 수정란은 파라핀 오일로 도포된 M16 배지에서 2~3 차례 세척한 후, 37℃ 항온반응기로 옮겨 보관해두었다.

15

2) 수정란에 DNA 주입

미세조작기(micromanipulator)를 이용하여, 상기 실시예 2-1)에서 채취한 수정란에 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO를 주입하였다.

20 <실시예 4> 본 발명의 프로모터의 조절 하에 인간 EPO를 생산하는 형질전환 생쥐의 제조

상기 실시예 3에서 제조한 수정란을 이용하여, 본 발명의 프로모터의 조절 하에 인간 EPO를 생산하는 형질전환 생쥐를 다음과 같이 제조하였다.

25

1) 정관결찰 생쥐의 제조

대리모를 위임신시키는데 사용할 정관결찰 생쥐는 다음과 같이 제조하였다.

6주령의 수컷 ICR 생쥐를 선택하여 마취시킨 후, 핀셋과 가위로 치
30 골에서부터 약 1.5cm 되는 상부의 외피를 정중선을 따라 약 1cm 가량 절개

하였다. 절개구가 접치지 않도록 오른쪽 또는 왼쪽으로 비켜서 근층을 절개하고, 음낭으로 내려와 있는 정소를 복강 내로 이동시켰다. 핀셋으로 정소, 정소상체 및 정관을 분리한 후, 정관 주변의 막을 핀셋으로 분리하여 달군 핀셋으로 정관을 끊어주었다. 정관이 분리된 것을 확인한 후, 근층을
5 불합하고 마취가 깰 때까지 가온기에 두었다.

2) 위임신 대리모 생쥐의 제조

실험일 전에 발정이 확인된 ICR 암컷 생쥐를 상기 실시예 3-1)에서 제조한 정관결찰 생쥐와 교배시켰다. 실험일 오전에 암컷 생쥐에서 플러그
10 가 생성되었는지를 관찰하여 위임신 여부를 확인하였다.

3) 난관 내 이식

상기 실시예 2의 2)에서 제조한 수정란을 이식용 피펫에 일렬로 배열하였다. 마취시킨 대리모 생쥐의 외피와 근층을 조금 절개하고, 홍채핀
15 셋을 사용하여 난소, 난관 및 자궁각의 상부를 체외로 끌어내었다. 난소낭을 통해 보이는 부분이 위로 가도록 난소의 위치를 잡고, 지혈 크렌메로 지방조직을 끼워 고정시켰다.

실체 현미경 하에서 난소낭의 막을 절개하고, 난관과 난소를 끌어당겨 난관체를 찾아, 이식용 피펫의 앞쪽 끝부분을 2~3mm 삽입하여 수정
20 란을 배양액과 함께 난관 내로 조심스럽게 주입하였다. 피펫 내의 기포 두 개 중 마커로 하는 첫번째 기포가 난관 내에 삽입되는지 관찰하여 수정란이 확실히 주입되는 것을 확인하였다.

상기 대리모 생쥐로부터 자손을 얻고, 그 중 형질전환된 생쥐를 확인하기 위해, EPO의 엑손 1과 엑손 2를 프로브로 사용하여 노던 분석을
25 수행한 결과, 76마리의 생쥐 중 12마리가 형질전환된 것으로 확인되었다.

형질전환 생쥐에 대해, EPO 단백질의 발현 양상을 확인한 결과, 예상한 바와 같이 EPO 단백질은 방광 특이적으로 발현됨을 알 수 있었다(도
6).

30 <실시예 5> 본 발명의 형질전환 생쥐로부터 인간 EPO의 생산

1) 본 발명의 형질전환 생쥐의 소변 중의 EPO 발현을 확인

본 발명의 형질전환 생쥐의 소변 중의 EPO 발현을 확인하기 위해, 형질전환 생쥐로부터 소변을 얻어 여과한 후, HPLC 분석을 수행하였다. 각 분획의 단백질 성분을 조사하기 위해, 전기영동 및 웨스턴 분석을
5 수행하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.

도 7a의 전기영동결과 및 도 7b의 웨스턴 분석결과에 나타난 바와 같이, 본 발명의 형질전환 생쥐로부터 얻은 소변 중에는 EPO가 높은 농도로 존재하였다.

소변 중의 EPO 농도를 수치화한 결과, 0.5~1mg/ml 수준인 것으로
10 나타났는데, 이러한 발현율은 기존의 형질전환동물에서 볼 수 있는 우유 중의 단백질 발현율에 비해 현저하게 높은 것이다.

따라서, 본 발명의 프로모터를 이용하여 제조한 형질전환동물은 우수한 효율로 소변 중에 목적 단백질을 생산하게 할 수 있다.

15 2) 본 발명의 형질전환 생쥐로부터 얻은 EPO의 생리활성 확인

본 발명의 형질전환 생쥐로부터 얻은 EPO의 생리활성을 확인하기 위해, 실시예 3의 1)에서 얻은 EPO를 EPO 의존성인 간세포에 첨가하고 배양하였다. 이때, 비교군에는 시판 중인 EPO를 첨가하였다. 배양한 지 24,
48, 72 시간별로 세포의 생존율을 측정하여, 그 결과를 표 1에 나타내었다.

20 <표 1>

배양시간	DMEM/F12(%)	FBS	FBS+시판 EPO	FBS+본 발명의 EPO
24	38.5 ±6.8	54.9 ±4.3	58.2 ±6.6	72.1 ±4.7
48	21.6 ±7.4	39.9 ±2.9	50.0 ±2.4	60.4 ±7.5
72	10.0 ±4.6	20.8 ±11.7	39.6 ±3.8	53.9 ±4.0

표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 형질전환 생쥐의 소변에서 분리한 EPO는 모든 시간대에 있어서, 시판 중인 EPO보다 더 높은 생리활성을 나타내는 것으로 관찰되었다.

25 따라서, 본 발명의 프로모터를 이용하여 제조한 형질전환동물을 통해, 기존의 방법으로 얻을 수 있는 단백질보다 훨씬 우수한 생리활성을 나

타내는 단백질을 얻을 수 있다.

<실시예 6> 조절인자들을 포함하는 본 발명의 발현 벡터의 제조 및 효율성 확인

5 1) 조절인자들을 포함하는 본 발명의 발현 벡터의 제조

본 발명의 UP2 프로모터의 조절 하에 EPO 생산을 극대화할 수 있는 벡터 시스템을 확립하기 위해, pUP2/hEPO 벡터에 선택적 표지 유전자 및 조절인자를 도입하여 다음과 같이 일련의 개량된 벡터들을 제조하였다.

10 1-1) pUP2/hEPO-Neo 벡터의 제조

UP2 프로모터의 조절 하에 단백질을 발현할 수 있는 세포주(cell line) 구축시 효율적인 선택적 표지 유전자를 벡터 내에 삽입하기 위해, 네오마이신 저항성 유전자를 다음과 같이 pUP2/hEPO 벡터에 도입하여 pUP2/hEPO-Neo 벡터를 제조하였다.

15 네오마이신 저항성 유전자를 얻기 위해 pEGFP-N1 벡터(Clontech)를 주형으로 하고, 정방향 프라이머(서열번호 8)와 역방향 프라이머(서열번호 9)를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다.

서열번호 8: 5' - GCGGCCGCGCGCGTCAGGTGGCAC - 3'

서열번호 9: 5' - CGATCGGACGCTCAGTGGAACGAAAAC - 3'

20 그 결과 얻은 1.9 Kb의 PCR 산물을 pGEM T-easy 벡터에 삽입한 후 NotI 제한효소로 절단하여, 클로닝에 사용할 네오마이신 저항성 유전자 부분을 준비하였다.

본 발명의 pUP2/hEPO 벡터의 암피실린 저항성 유전자(ampicillin-resistance gene) 부위를 NotI과 SalI 제한효소로 절단하여 제거함으로써, 클로닝에 사용할 벡터를 준비하였다.

25 상기와 같이 준비한 네오마이신 저항성 유전자와 벡터를 연결하여, 네오마이신 저항성 유전자가 기존의 pUP2/hEPO vector에 삽입된 pUP2/hEPO-Neo 벡터를 제조하였다.

30 1-2) I/pUP2/hEPO 벡터의 제조

UPII 프로모터의 조절 하에 단백질을 안정적으로 발현할 수 있는 발현 벡터를 얻기 위해, 인슐레이터 유전자를 다음과 같이 pUP2/hEPO-Neo 벡터에 도입하여 I/pUP2/hEPO 벡터를 제조하였다.

인슐레이터 유전자는 닭(chicken)의 B-글로빈 유전자(B-globin) 인슐레이터 유전자가 포함되어 있는 pBC1 벡터(Invitrogen)를 주형으로 하고, 정방향 프라이머(서열번호 10)와 역방향 프라이머(서열번호 11)를 사용하여 PCR 반응을 수행하였으며, PCR 효율을 높이기 위해 2 카피(copy)를 증폭하였다.

서열번호 10: 5' - TCGACTCTAGAGGGACAG - 3'

10 서열번호 11: 5' - CTCAGTGAAGTCCGTTTCT - 3'

그 결과 얻은 2.4Kb의 PCR 산물을 pGEM T-easy 벡터에 삽입한 후 NotI 제한효소로 절단하여, 클로닝에 사용할 인슐레이터 유전자 부분을 준비하였다.

상기와 같이 준비한 인슐레이터 유전자와 1-1)의 벡터를 NotI site로 연결하여, I/pUP2/hEPO 벡터(도 8)를 제조하였다.

1-3) pUP2/hEPO(WPRE) 벡터의 제조

UPII 프로모터의 조절 하에 단백질을 대량으로 발현할 수 있는 발현 벡터를 얻기 위해, WPRE 유전자를 다음과 같이 pUP2/hEPO-Neo 벡터에 도입하여 pUP2/hEPO(WPRE) 벡터를 제조하였다.

WPRE 유전자를 클로닝하기 위해 정방향 프라이머(서열번호 12)와 역방향 프라이머(서열번호 13)를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다.

서열번호 12: 5' - ACCAGGTTCTGTTCCTGTTAATCAACCTC - 3'

서열번호 13: 5' - CTCGAGGAGCCCGAGGCGAAACAGGCG - 3'

25 그 결과 얻은 0.6 Kb의 PCR 산물을 pGEM T-easy 벡터에 삽입한 후, 상기 실시예 2)에서 얻은 pUP2/hEPO-Neo의 NcoI 제한효소 위치에 다시 삽입하였다. 상기 벡터를 BspHI 제한효소로 절단하여 클로닝에 사용할 WPRE 유전자 부분을 준비하였다.

한편 본 발명의 pUP2/hEPO 벡터의 EPO 유전자 뒤쪽을 NcoI 제한효소로 절단하여 클로닝에 사용할 벡터를 준비하였다.

상기와 같이 준비한 WPRE 유전자와 벡터를 연결하여, pUP2/hEPO(WPRE) 벡터(도 9)를 제조하였다.

1-4) I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터의 제조

- 5 UPII 프로모터의 조절 하에 발현량의 극대화, 발현의 안정화 및 효율적인 세포주 구축을 모두 충족시킬 수 있는 발현 벡터를 얻기 위해, 다음과 같이 I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터를 제조하였다.

상기와 같이 1-2)에서 준비한 인슐레이터 유전자와 1-3)의 벡터를 NotI site로 연결하여 I/pUP2/hEPO 벡터(도 10)를 제조하였다.

10

2) 본 발명의 발현 벡터들의 효율성 확인

상기 실시예 6에서 제조한 발현 벡터들의 효율성을 다음과 같이 확인하였다.

- 15 2-1) 본 발명의 발현 벡터들에 대한 PCR 분석

본 발명의 발현 벡터들에 의한 EPO 유전자의 발현량을 확인하기 위해, 다음과 같이 실시간 PCR(real-time PCR)을 수행하였다.

- 상기 실시예 6에서 제조한 본 발명의 발현 벡터 4종류를 형질도입
 20 키트(transfection Kit, Effectene, Qiagen)를 이용하여 방광 세포주 RT4에 도입한 후 계대배양을 거쳐 안정된 세포라인(stable cell line)을 구축하였다. 각 세포주로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 추출하여 PCR을 수행함으로써 형질도입 이 제대로 이루어졌음을 확인하였다.

- EPO 유전자의 발현량을 확인하기 위해 4종류의 세포로부터 Total RNA를 뽑은 후 RT-PCR을 하여 cDNA를 증폭하였다. 상기 cDNA를 주형
 25 으로 하고 EPO의 엑손 부분을 증폭할수 있는 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.

- 각각의 세포에서 발현량을 확인하기 위해 세포 내에서 일정량으로 발현되는 유전자(house keeping gene)인 GAPDH를 대조군으로 사용하여 3차
 30 례의 반복실험을 함께 수행하였으며, 결과는 통계프로그램인 SAS를 이용하여 통계처리하고 도 11에 나타내었다(pUP2: pUP2/hEPO 벡터,

IUP2:I/pUP2/hEPO 벡터, PW:pUP2/hEPO(WPRE) 벡터,
IW:I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터).

도 11에 나타난 바와 같이, 본 발명의 발현 벡터들은 pUP2/hEPO
벡터, I/pUP2/hEPO 벡터, pUP2/hEPO(WPRE) 벡터, I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터
5 의 순으로 높은 EPO 유전자 발현율을 보였다.

특히 WPRE와 인슐레이터를 함께 포함하는 I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡
터는 별도의 조절인자를 포함하지 않는 pUP2/hEPO 벡터에 비해 50배 정
도 높은 발현율을 나타내었다(도 11b).

따라서 I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터를 비롯한 본 발명의 발현 벡터들
10 은 EPO의 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

2-2) 본 발명의 발현 벡터들에 대한 웨스턴 분석

본 발명의 발현 벡터들에 의한 EPO 단백질의 발현량을 확인하기
위해, 다음과 같이 웨스턴 분석을 수행하였다.

15 상기 실시예 6의 2-1)에서 본 발명의 발현 벡터들을 각각 도입하여
구축한 세포주들을, NP-40이 포함된 용해 완충액(lysis buffer)에 넣고 초음
파 처리하여 단백질을 추출하였다.

각각 40 μ g의 단백질을 SDS-PAGE 겔에 전기영동하여 PVDF 막으로
전이시킨 후, EPO 항체를 처리하여 EPO 단백질 발현량을 확인하였다. EPO
20 단백질의 발현량을 정량하기 위해, 액틴(Actin)에 대한 항체를 대조군으로
사용하게 2차례의 반복실험을 함께 수행하였다. 결과는 통계프로그램인
SAS를 이용하여 통계처리하고 도 12에 나타내었다(pUP2: pUP2/hEPO 벡터,
IUP2:I/pUP2/hEPO 벡터, PW:pUP2/hEPO(WPRE) 벡터,
IW:I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터).

25 도 12에 나타난 바와 같이, 본 발명의 발현 벡터들은 pUP2/hEPO
벡터, I/pUP2/hEPO 벡터, pUP2/hEPO(WPRE) 벡터, I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터
의 순으로 높은 EPO 단백질 발현율을 보였다.

이러한 결과는 상기 실시예 7의 1)에서 나타난 결과와 일치하는 것
이다.

30 따라서 I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터를 비롯한 본 발명의 발현 벡터들

은 EPO의 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

[산업상 이용가능성]

- 본 발명의 프로모터는 방광 특이적인 목적단백질 발현을 유도하며,
5 기존의 방법에 비해 매우 높은 농도로 소변 중에 목적단백질을 발현한다.

- 본 발명의 프로모터 및 그 조절을 받는 목적단백질로 이루어진 발
현 벡터로 형질전환된 동물은 기존의 형질전환동물에 비해 훨씬 높은 효
율로 소변 중에 목적단백질을 분비한다. 또한 본 발명의 형질전환동물로부
터 얻은 단백질은 기존의 동종 단백질이 나타내는 것 이상의 우수한 생리
10 활성을 나타낸다.

따라서 본 발명의 프로모터, 이를 이용한 발현 벡터 및 형질전환동
물은 의약학적으로 중요한 가치를 지닌 유용단백질의 생산 분야에 유용하
게 사용될 수 있다.

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 표시
(PCT 규칙 13bis)

A. 아래의 표시는 명세서 _____ 8 _____ 쪽, _____ 16 _____ 줄에 언급된 기탁된 미생물 또는 기타 생체물질에 관한 사항입니다.	
B. 기탁내용 추가 기탁내용이 추가용지에 계속됨 <input type="checkbox"/>	
기탁기관의 명칭 한국유전자은행 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)	
기탁기관의 주소(우편번호, 국가명 포함) 대전시 유성구 어은동 52 한국생명공학연구원 유전자원센터	
기탁일자 2002년 10월 17일	기탁번호 KCTC 10352BP
C. 추가표시 (해당없는 경우에는 공란) 추가용지에 계속됨 <input type="checkbox"/>	
D. 표시대상 지정국 (기탁표시가 모든 지정국에 대한 것이 아닌 때)	
모든 지정국가	
E. 표시의 별도제출 (해당없는 경우에는 공란)	
다음의 표시는 추후 국제사무국에 제출될 것임 (표시의 일반사항, 즉 기탁번호 등을 기재):	

수리관청용
<input type="checkbox"/> 이 서류는 국제출원과 함께 접수됨
담당자

국제사무국용
<input type="checkbox"/> 이 서류는 _____ 일자로 국제사무국에 접수됨
담당자

PCT/RO/134 (July 1998)

[청구의 범위]

[청구항 1]

서열번호 1의 구조를 갖는 돼지의 유로플라킨 II 유전자의 프로모

5 터

<서열번호 1>

gggctaggagtggaatcagagctggcctatgccacagcaacgcagaatccaaaccacatctccgacctaca
ccagaccgtcaccataaacacaggatccttaaccactgagcaagggtcagggatcaaaccctcatggatactagt
cgggttcttaacccgctgagccacagtgggcactcctgttttgtttgtcttcgttttggctgcatctgcagcatalacagaa
10 gttcctgggttaaggattgaacccatgccacagcagcaaccggagccacagcagtgacaacagcctgatccttaactgct
agaccaccagggaacgccccctcaactttcatgccttgaaaccctgagtcagtacaacctgacaatngnttttttttttt
tttttgccttttctagggccacttcccgcgcatgtggagattcgcaggctanagggtctaateggagctgtagccaccggc
ctacaccagagccatagcaacgagggatccgagccgagtcgtgcaacctacactacagctcatggcaacaccggatcgtt
aaccactgagcaaggccaggggatcgaaccgcaacctcatggttcttagtcagattcgttaaccactgcacatgaca
15 ggaactcccaacctgacaatttatcatttctgcaccctagtgtgtgagtaattgaaaaattcccaagatgtcaagggtcagtgt
gatggtaattttatgtgtcaacctgactagggcatgttcccggatgtggagtcattgttattctggatgttactgtgaagatat
gttttgatgaaattaacatttaaatcagtggggggaaaaaagaagttctcgttctggtgcatcagaacaaatccgacta
ggaaacaagcgggtgcaggttcgatccctggcctcacttagtgagtcaggatctggcgttcccgtagctgtgtgtacag
gtggcagatgcagctcggatctagcattgctgtggctgtggtgttaggccagcagctgtagctctgattaaaccccaagtct
20 gggaacctccatagccgtgggtgtggcccgaaaaagcaaaaaataataataataaatttaaccagggggattttgag
caaagcagattacccataataatgggtgggtctcatcaagttcattgtaggccctagtggaaacaagaccgacctccacctt
ctcccatgagaaggaaagaattctgcaaaagaccgccttnggacntaaactgcaactcttctgagttccagcatgtt
ggcctcccccacagacttggacttgccaagcctccgcaattgcatgagccaattccttaaaataaatccgtctatatatac
acatcctgttggttctgtttctccagagaacccigactaacgcagctcgcacccctgaagaccagtgtgtccacactcagc
25 tgggtgtcacctccaaacactcagccttctcaaggctctttctagctgtgtcctcctctccccacaacagctgtttcaaaactc
tcacccctctcagggcgcaatcccttctcctcctgagtttctacttccagagaaagcagagaccttcaggagtgtgct
gccttaacttacttcttcatccctcagccttgcaaaagtataagcttctctgcaccactgccccattcttctctgcagacag
ggtcattcctaaagccaaacgctaatacctccacctctgatctgagtcctatctttccctcctccagaagcttctcctataaatt
ctaccccttttcttcttcttcttcttgaacaaaaatggaagacagccttccggtgtgtgtgagcggaacagtggtg
30 ccttggaaagcgtgggacgcaggttcgacccctggcccagcatagtggttaaggatccagtggtgccacagtttggcctt

agattgaaactgcagctcagatctggccctggcctgggaactcatacgccacaggacggcccaaaaagaaaagaaag
aaaaataaaaaacaaaacagaaaagccttctgtacccccaattccctccagttatctctcttccctcccagccaag
ctctgcaaagagcggctgcacagttctaactctacctctccagttggccctggactttctcagcttggtttctacccccct
cacccgtaggaatctgctcigaaggacacgcacccctcacgactctggcccaggacatttttgtaccagcctttcaatc
5 ctgaccttcataatcaccgacacctcttctgtgaaacctccatccactttctcctgggtccctcctaagaccattccgctt
cttcagccccctccctccatctgtcctttagatgccgcaatttcttagtatcctgtcctgcgcggnctcgtccttccctccaca
ctctcttcaaggactcttttccatgtgcgattttgccatggcccaccttccctctctttaccagactttccccgggtgctcc
agactcatagactcaattatgaaaacatagttttcatctgatttggccaagataattgcattagtattactgtataacagcttate
ccccaatttagtggttataaaataaacacttattctgagaatcagaaacctaggcaggacatagttggggctcatgaagtt
10 gcactgaaaaatgtccccctgggctaatacagaggactgaccagggtggaggatctgttccaagctcattcattcaca
tgcccgtaggttgagacagctcttctgtgactctggcaggagcctcaattcctgtcacgtggacctccccctggagggg
gtcccatgtcctccatggtgagtaatccatgagagcaaggtggaaggtgccatgccatttaggacctagcctcaggaggg
acctacgtcacttctgtgtagctgttggccacacagactaacctgacacaatgcacccatccatgacctgctgccagtc
cattctccacactgtttccagaatgatattacataagtaaaactcctcaaaggcttttgagattttttccattatagttgattta
15 taacctcagaggcttttcttctcagcataaaaaaccaagttccttaacatagcatgtaacctactggccacctgcccagtg
gctagaactctcaccatgtccatccttgaatactgcttctagccaagagctattgtttgcagttccagaatgtgtcgggafa
actcacatctctgagccttttcatgtgtgttccctcactttggaatatcccttccatttaggaaggctaattgtccattcattntc
caaaactcagaagcaaatttttttttttttttttttttttggcttttagggccgaactctcagcatatggagggtcccaggta
gccatcaaattggaattgtagctgtgtggcctacaccacagccatagcaacaccagacccaagtcacatctgcaacctacat
20 cacagatcatggcaatactggatccttaacctactgagtgagcccaggatcaaacacaaattctcatgatactgccag
gttcattaccactgagccacaacaggaactcctctccttttatgggtcacacctgcagcatatggaagtctgggccaggg
attgaatctgagtgagcgtgtgacaatgccgtatcctttaattcactgtgtgggtgaggggntaaantggccctcctaa
'aaaacctgagctgtgtcagttggattcttaatccactgcaccacaagggggaagggtcaagaactgtcttgccatctctgtat
cttatcacctagcatagtaccaccatagagaagtgctcaacaaatgtttactgaatgaataatgcatgagctggagtcc
25 cattgcggctcagcagtaacaaacctgactagcattcataagaacttgggttcgatccctagcctcagtggttaaggatgc
agcattgctgtgagctgtggtgtaggtgcgagcagacactcagatcccacattgctgtcactgtggcgagccggcctct
gtagctctgattcgactcctagcctgggaacgtccatagccacaggtgagggccctaaaaagaaataaataagcaagcaa
gtaagcaagcaggcagtttcttgggtgccttgtaacctgtggcctgtgtgtgtatacaagtaacagctgatccatgtctcagtc
atgtttccccctcagactaccttctcctgccccatctctcccttgacataattggaaaaacaaattcagaattttgtcccactacc
30 ttcttgctagctctgtggccttgggaaagctatttattgcctctgagcctctaattttcatctgcaccaaggattaataaaaagg

agaggataagatgaattactatataatatttattgaaccagatactgtgctaggcactctaaataaattagcttgagtata
gtcatagtaacctggtgagacagatttttttcttttatggtgcacgtgcaacatatggaagttcctgggctggggtcgaat
tggagctgcaggtgcttgccatgccacagccatggcaacatatacaaaacgcacctgtgacctacaccacagattgc
agcaacgctggatccttcacccaaggagcaaggccaggaatcaaattgcatcctcacaaacactatgtccggttttaac
5 ccgctgagccacaccaggaactccatggcgagacagattttatactctgtctacagaaggaggaaagtgaagctcagaatg
gttaggtaggttaacttggccaagatcaaaaaaattcaaagaagatttggggcaagtggatcatggcagcattagaaaa
aataaagaagcatccacttgtttccaacactgaacaactgagattttctactctcacagcttttccagcttcataccaagga
cagacgctctgccattttcccatcagaccaatatttgcigaacactgcacccttacttttaggtccaagtcaccaggggtttcc
cagttgtcctacagattctgacactatctccacattttttgcacctttattttaagcattttatacctgtcataccttgctaga
10 taaatgggaagggaatgaatcttccatttatagggtgagaaaattgaggttcaaagtactcaccaaaagtcataatagcatca
ctcctcaacaggaggacagcagctcccaccagagggttaacatgtccatggagcctagtggacacatttttaactgactg
ggaagcagcagagtggtattgtgaagggggaatcataggtatatcaaacagacttaggttctgatccgagctattctgcttg
caaacaaccatagttcaatttaaaaaaaaaaagaaagaaagaaaagaaagagagccccatcctggtgagtgga
acaaattcaactaggaactgtgaggttgtgggtcgtacccctggccttgctcagtggttaaggatctggcgttgccatgag
15 ccgtggtgtaggtgacagactcaactcagatctggcgttgctgtgactgtggctgtgatgtaggctggcagctgtaactccg
gttagacccagcctgggaacctccatatgaacctccatatgcgggtgggtgtggccctaaaaagaaaaaaaaaaaaa
aagaggaattcccttatggctcagcaggttaaggatctggtattgtcactgctgtggcctagttagcagccatagtcaggtt
caatccctggcccaggaacgtctgcatcccacaggtgtggccaaaaagaaagaaaggaaggagtctgtgtggcaca
ataggattggcaacatcttaggagtactgggacacaggttcaatccctggcccagcacagtgggtaaggagccagtggtg
20 ctggtcaaaaaagaaaagaaaaagtaaccatagttagagtaaattctgttttaggagctattcttggggcagaacagagagat
caggagctccttgagagcagaaacttacctttacatccctcgtgccfagcacggttctaggggcatacctggtatttaataaa
tatagccaactggataggggattggaaggaaagagcaggggaggggaacttgagtgaattgaaaaattgagaatccaaa
ggggagacagcctagaaagagtaggtccaagaaagagatcccaggcatttggccctggttcccttttccaagccatg
aggaaatcctcagaggaaacagagtgtgtggctttaaattgacttcagcgttgcattgaatctgctcggctaaaagagtat
25 cctcttgctccttgctgtcctccccctcctcagctcccaaaccttctcggctgctgtgatgggataattagatgcgag
agctcagcacagatgatgtccagttgcctagcaactaatggttccatggagaccgcaaagcacagcctccagagcag
ccagtgagcagctcggcagggcagggagaagacgaactctcagctcctccagaaacctggggagggccaggagt
gggaagaaagggggggaatcgaggggcttaaaggcacaggccccctttatcctttaaattctggtcagagctctgccctc
ccctccctactctgtcccactcataattcagatggagtgggggcttaggagtggaccaacacaacctaccctgcaata
30 aacccaaccttcttctgcttctggttgtggctgaaaatggnaaaaagaaatctcccaagtgaagtgaacancntcctg

25

30

33

[청구항 3]

제 1항 또는 제 2항의 프로모터 염기서열 및 그 3' 쪽으로 목적단백질을 암호화하는 염기서열을 포함함을 특징으로 하는 발현 벡터

5 [청구항 4]

제 3항에 있어서, 목적단백질은 인간 EPO(erythropoietin)임을 특징으로 하는 발현 벡터

[청구항 5]

10 제 4항에 있어서, 기탁번호 KCTC 10352BP로 기탁된 발현 벡터 pUP2/hEPO

[청구항 6]

15 제 4항에 있어서, 선택적 표지 유전자(selective marker)로 서열번호 5의 네오마이신 저항성 유전자(neomycin-resistant gene)를 포함하며, UP2 프로모터의 5' 쪽에 서열번호 6의 인슐레이터(insulator)를 포함함을 특징으로 하는 I/pUP2/hEPO 벡터

<서열번호 5>

gcggccgcgcgctcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctattgtttattttctaaataca
 20 ttcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgctcaataatattgaaaaaggaagagtcctgagcgga
 agaaccagctgtggaatgtgtgtcagttagggtgtggaagtcgccaggtcccccagcaggcagaagtatgcaaagcat
 gcatctcaattagtcagcaaccaggtgtggaaagtccccaggtcccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctc
 aattagtcagcaaccatagtcgcccccctaactccgccatcccgcccctaactccgccagttccgcccattctccgcc
 catggctgactaattttttatttatgcagaggccgaggccgcctcgccctctgagctattccagaagtagtgaggaggctt
 25 ttggaggcctaggcttttgcaaagatcgatcaagagacaggatgaggatcgtttcgatgattgaacaagatggattgca
 cgaggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggtatgactgggcacacagacaatcggtgctctgatgccg
 ccgtgttccggctgtcagcgcagggcgcccggttcttttgtaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaag
 acgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacggcggttccttgcgcagctgtgctcgacgtgtcactgaagcgg
 gaagggactggctgctattgggcgaagtgcggggcaggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatcc
 30 atcatggctgatgcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggtacctgccattcgaccaccaagcgaaacatcgcat

cgagcgagcacgtactcggatggaagccggtcttgcgatcaggatgaatctggacgaagagcatcaggggctcgcgc
 agccgaactgttcgccaggctcaaggcgagcatgcccgcggcgaggatctcgtcgtgacccaatggcgatgcctgcttg
 ccgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggaatcatcgactgtggccggctgggtgtggcgaccgctatcaggac
 atagcgttggctacccgtgatatgtgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgctttacggtatcgccg
 5 ctcccgatcgcagcgcatcgcccttctatcgcttcttgacgagttcttctgagcgggactctggggttcgaaatgaccgac
 caagcgacgcccacctgccatcacgagattcgattccaccgcccttctatgaaagggtgggcttcggaatcgtttcc
 gggacgccggctggatgatcctccagcgggggatctcatgctggagttcttcccaccctagggggaggctaactga
 aacacggaaggagacaataaccggaaggaacccgcgctatgacggcaataaaaagacagaataaaacgcacggtgttg
 ggtcgtttgtcataaacgcgggggttcggtcccagggtggcactctgtcgataccccaccgagaccccatggggccaa
 10 tacggccgcttttcttcttttcccccccccccccaagttcgggtgaaggcccagggtcgcagccaacgtcggggc
 ggcaggccctgccatagcctcaggttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcattttaattaaaggatctaggtga
 agatccttttgataatctcatgacaaaaatccctaacgtgagtttcttccactgagcgtccgatcg

<서열번호 7>

15 tcgactctagaggacagccccccccaaagccccagggatgtaattacgtccctccccgctaggggca
 gcagcgagccgcccggggctccgctccggctccggcgtcccccgcatcccgcagccggcagcgtgcggggacag
 cccgggcacgggggaaggtggcacgggatcgcttctctgaacgcttctcgtgctctttgagcctgcagacacctgggg
 ggatacggggaaaaagctttaggctgaaagagagatttagaatgacagaatcatagaacggcctgggttgcaaggagc
 acagtgtcatccagatccaacccctgctatgtgcagggtcatcaaccagcagcccagggtgccagagccacatcca
 20 gcctggcctgaatgcctgcagggatggggcatccacagcctccttgggcaacctgttcagtgcgtcaccacctctggg
 ggaaaaactgcctcctcatatccaacccaaacctcccctgtctcagtgtaaagccattccccctgtcctatcaagggggag
 ttgtgtgacattgttggtctgggtgacacatgtttccaattcagtgcacacggagaggcagatcttggggataagga
 agtgcaggacagcatggacgtgggacatgcaggtgttgagggtctgggacactctccaagtcacagcgttcagaaca
 gccttaaggataagaagataggatagaaggacaaagagcaaggttaaaacccagcatggagaggagcacaaaaaggcc
 25 acagacactgctggctcctgtgtctgagcctgcatgtttgatggtgtctggatgcaagcagaaggggtggaagagcttgcc
 tggagagatacagctgggtcagtaggactgggacaggcagctggagaattgccatgtagatgttcatacaatcgtcaaat
 catgaaggctggaaagcctccaagatccccaagaccaaccccaacccaccctgcccactggccatgtccctcagt
 gccacatccccacagttcttcatcacctccagggtgacccccccacctccgtgggcagctgtgccactgcagcac
 cgctctttggagaaggtaaatcttgctaaatccagcccacccctcccctggcacaacgtaaggccattatctctcatcaac
 30 tccaggacggagtcagtgaggatggggctctagaggacagccccccccaaagccccagggaatgtaattacgtccc

tccccgctaggggcagcagcgagccgcccggggctccgctccggcgtccccgcacccccgagccggc
 agcgtgccccggacagcccgggcacgggaagggtggcacgggatcgcttctctgaacgcttctcgtgctctttgagc
 ctgcagacacctggggggataggggaaaaagctttaggtgaaagagagattagaatgacagaatcatagaacggc
 ctgggttgcaaaggagcacagtgtcatccagatccaacccctgctatgtgcagggtcatcaaccagcagcccaggct
 5 gcccagagccacatccagcctggccttgaatgcctgcagggatggggcatccacagcctccttgggcaacctgttcagt
 gcgtcaccacccctctgggggaaaaactgcctcctcatatccaacccaaacctcccctgtctcagtgtaaagccattccccct
 tgtcctatcaagggggagtttctgtgacattgttggctggtgggtgacacatgtttgccaattcagtgcacacggagagggc
 agatcttggggataaggaagtgcaggacagcatggacgtggggacatgcagggtgttgagggtcttgggacactctcaa
 gtcacagcgttcagaacagccttaaggataagaagataggatagaaggacaaagagcaagttaaaacccagcatggag
 10 aggagcacaaaaaggccacagacactgctggctccctgtgtctgagcctgcatgtttgatggtgtctggatgcaagcagaa
 ggggtccatgtccctcagtccacatccccacagttcttcacacctccaggggacgggtgacccccccacctccgtgggca
 gctgtgccactgcagcaccgctcttggagaaggtaaattctgctaaatccagcccgaccctcccctggcacaacgtaag
 gccattatctctcatccaactccagggaacggagtcagtgag

15 [청구항 7]

제 4항에 있어서, 선택적 표지 유전자로 서열번호 5의 네오마이신
 저항성 유전자를 포함하며, EPO 유전자의 3' 쪽에 서열번호 7의
 WPRE(woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element)를 포함함
 을 특징으로 하는 pUP2/hEPO(WPRE) 벡터

20 <서열번호 7>

accagggttctgttctgttaatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggattcttaactatgttgct
 ccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgttcccgtatggctttcattttctcctcctgtataa
 atcctgggtgctgtctctttatgaggagttgtggccggtgtcaggcaacgtggcgtggtgtgactgtgtttgctgacgcaa
 cccccactgggtggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgtttccccctccctattgccacggcgga
 25 actcatcgccgcctgccttggccgctgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgtgtcgggga
 agctgacgtcctttccatggctgctgcctgtgttggcacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtccttcggcc
 ctcaatccagcggaccttccctcccgcgccctgctgccggtctcgcggcctcttccgctcttcgcttcgccttcgcctcagacg
 agtcggatctcccttggggccgctcccgccctgtttgcctcgggctcctcag

30

[청구항 8]

제 4항에 있어서, 선택적 표지 유전자로 서열번호 5의 네오마이신 저항성 유전자를 포함하며, UP2 프로모터의 5' 쪽에 서열번호 6의 인슐레이터를 포함하고, EPO 유전자의 3' 쪽에 서열번호 7의 WPRE를 포함함을
5 특징으로 하는 I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터

[청구항 9]

제 4항 내지 제 8항 중 어느 한 항의 발현 벡터를 도입시킨 동물
수정란
10

[청구항 10]

제 9항의 수정란을 이식시켜 얻음을 특징으로 하는 형질전환동물

[청구항 11]

제 10항에 있어서, 돼지, 생쥐, 소, 닭, 양 또는 염소 중 선택된 하
나임을 특징으로 하는 형질전환동물
15

[청구항 12]

제 4항 내지 제 8항 중 어느 한 항의 발현 벡터를 도입시킨 동물
수정란을 대리모 동물에 이식하고, 상기 대리모 동물로부터 형질전환동물
을 얻고, 상기 형질전환동물의 소변으로부터 유용단백질을 분리·정제하는
단계를 이루어짐을 특징으로 하는 유용단백질의 제조 방법
20

[요약서]

본 발명은 돼지의 유로플라킨 II 유전자의 프로모터, 이를 포함하는 발현 벡터 및 상기 벡터를 이용한 유용단백질의 생산 방법에 관한 것이다.

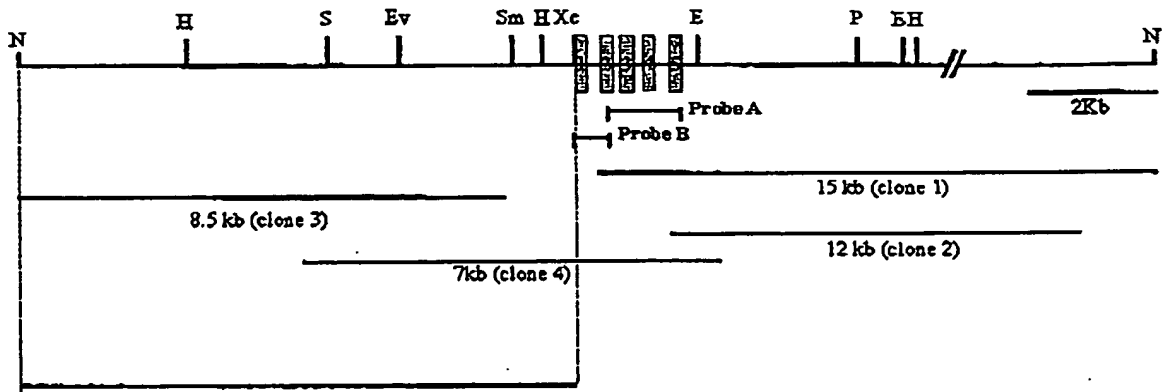
- 5 본 발명의 프로모터는 높은 효율로 목적단백질의 방광 특이적 발현을 촉진한다.

- 본 발명의 프로모터를 이용하여 목적단백질을 발현하도록 형질전환된 동물은 소변 중에 목적단백질을 고농도로 분비하며, 이렇게 하여 생산된 단백질은 기존의 동종 단백질이 나타내는 것 이상의 우수한 생리활
- 10 성을 나타낸다.

 따라서 본 발명의 프로모터, 이를 이용한 발현 벡터 및 형질전환동물은 의약학적으로 중요한 가치를 지닌 유용단백질의 생산 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

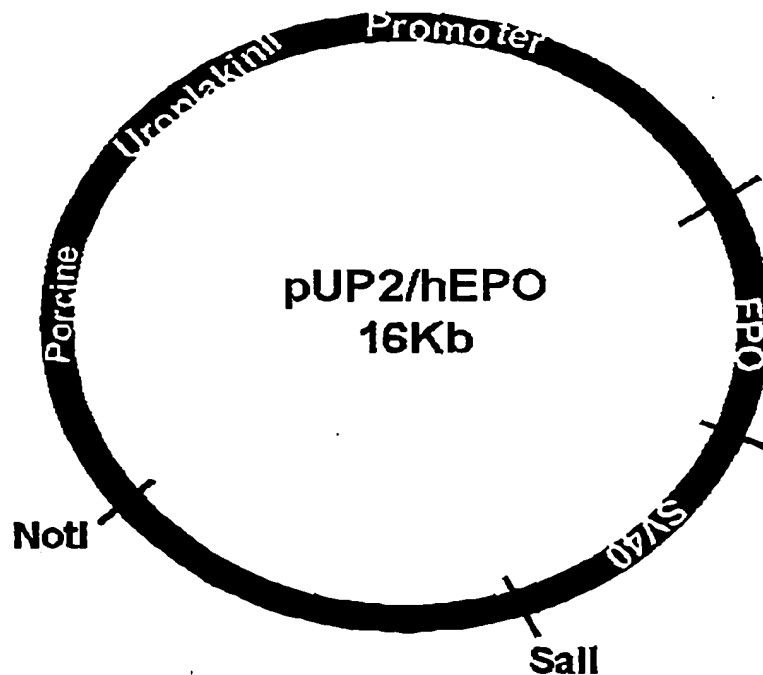
[도면]

[도 1]



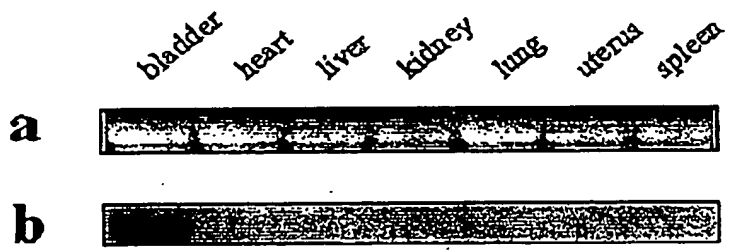
Porcine UPII promoter : 8847kb

[도 2]

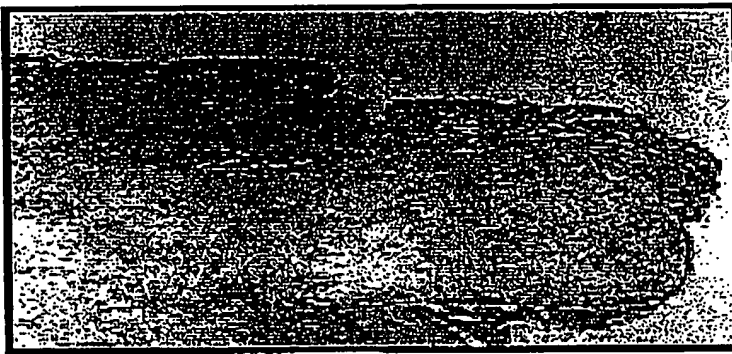


pUP2/hEPO Expression Vector

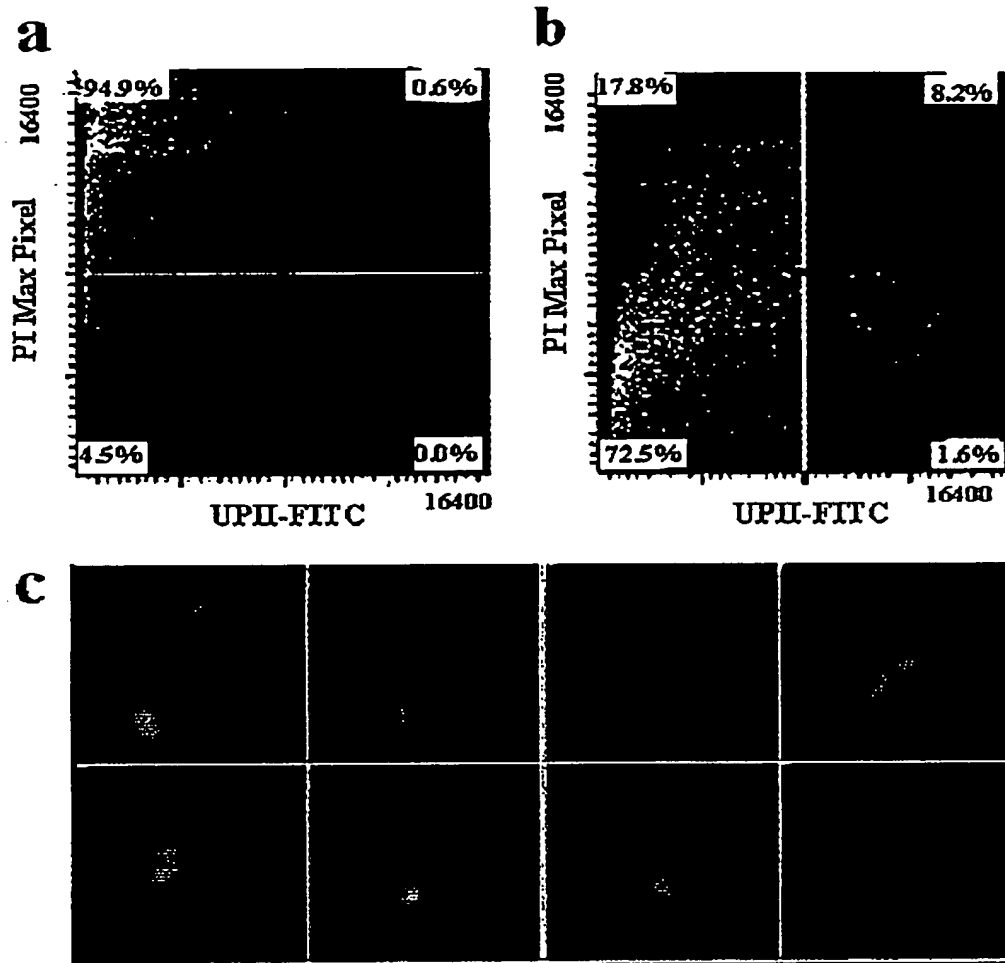
[도 3]



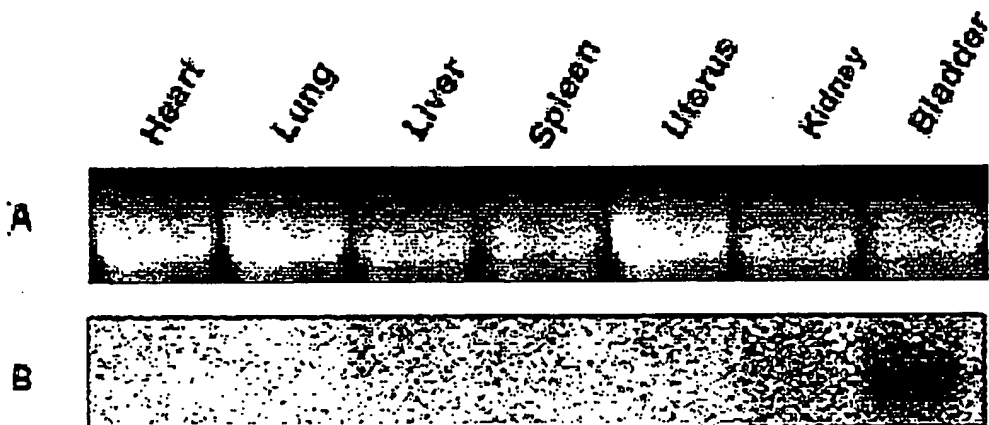
[도 4]

a**b**

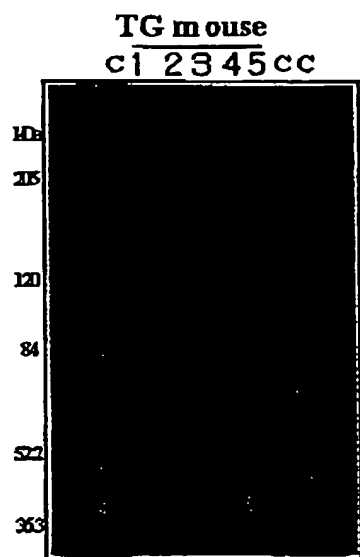
[도 5]



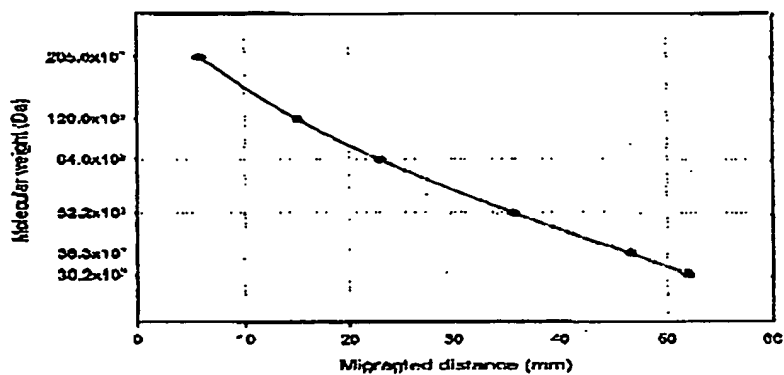
[도 6]



[E 7]

a

Separation of protein by SDS-PAGE (7.5%)



$$y = a * \exp(-bx) + c * \exp(-dx)$$

a: 496508.9

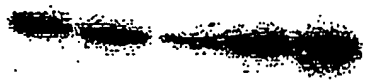
b: 0.1695

c: 191863.3

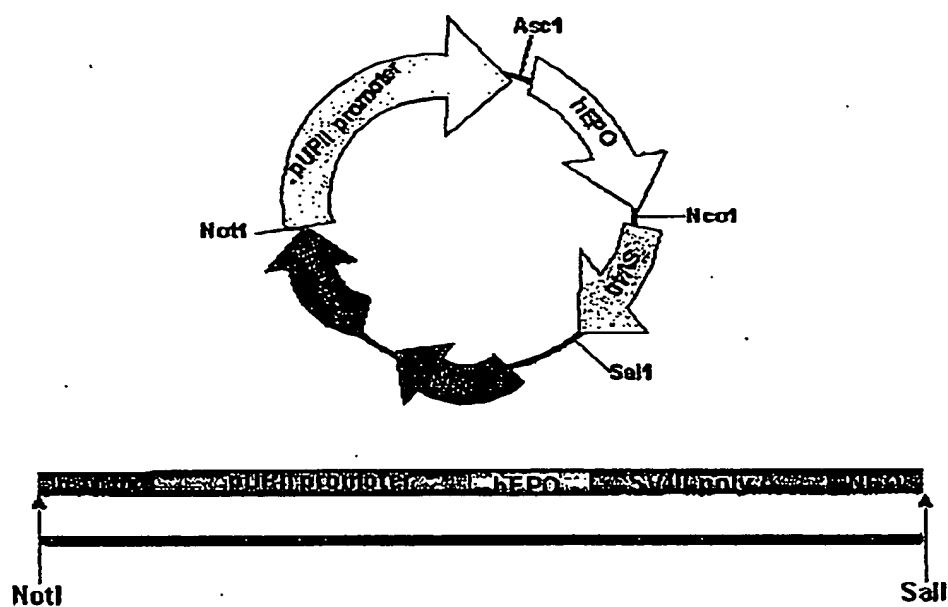
d: 0.0262

b

C 1 2 3 4 5 C

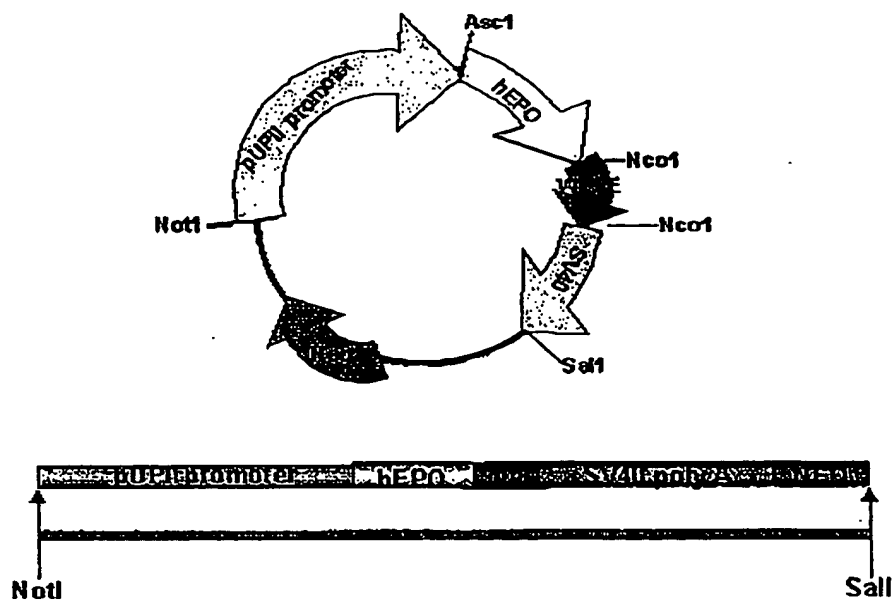


[도 8]



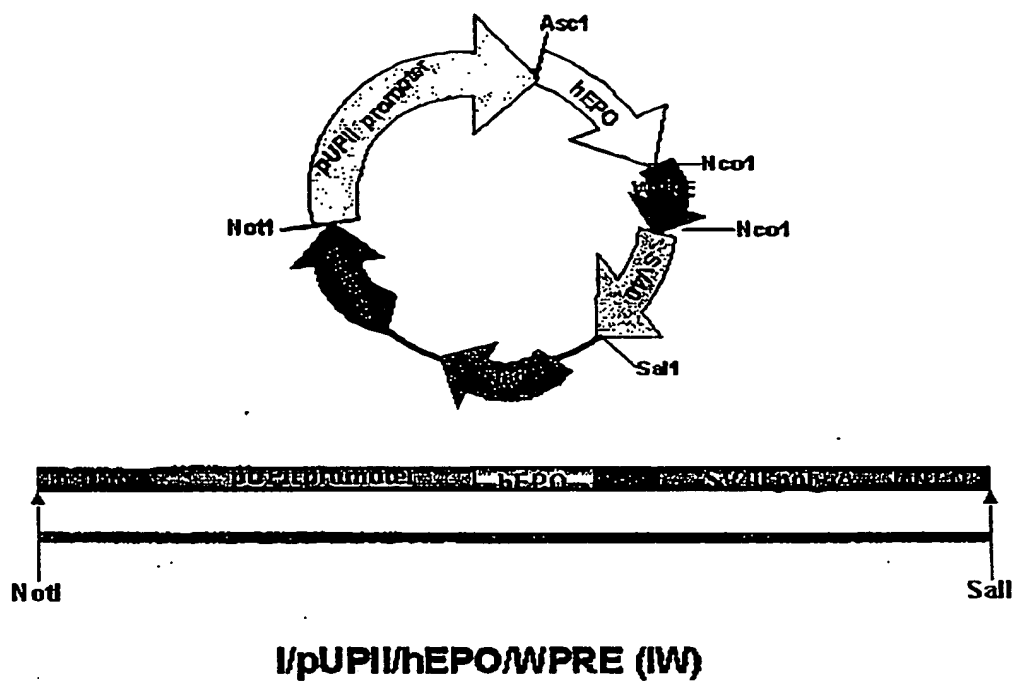
I/pUPII/hEPO (IUP2)

[도 9]



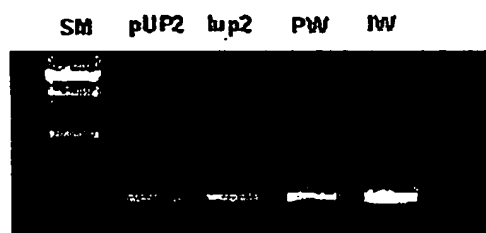
pUPII/hEPO/WPRE (PW)

[도 10]



[도 11]

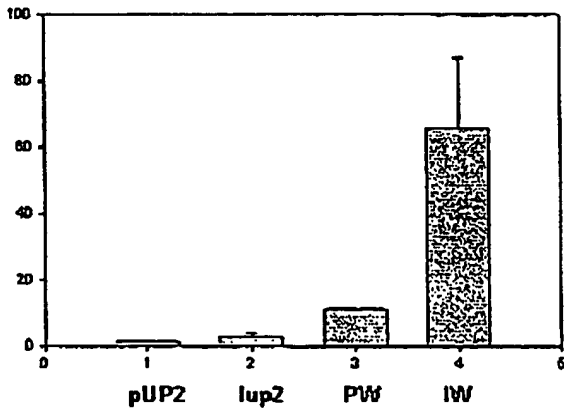
a



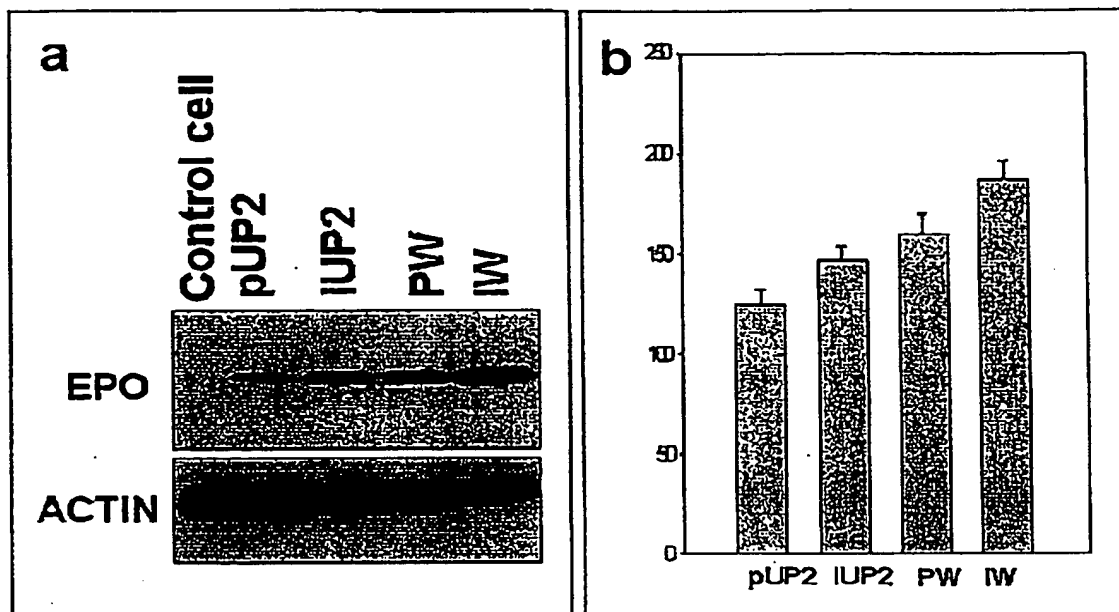
b.

pUP2	1.33±0.47
IUP2	2.35±1.9
PW	11.06±0.06
IW	65.49±21.71

c



[도 12]



Sequence Listing

<110> CHO-A PHARM CO., LTD.
KIM, Jin Hoi

<120> Porcine uroplakin II promoter and the production method of useful proteins using said promoter

<130> 03PP181

<150> KR 10-2002-0067856
<151> 2002-11-04

<150> KR 10-2003-0077256
<151> 2003-11-03

<160> 13

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 8847
<212> DNA
<213> Sus scrofa

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(8847)
<223> porcine uroplakin II promoter

<400> 1

gggctaggag tggaatcaga gctggcctat gccacagcaa cgcagaatcc aaaccacatc	60
tccgacctac accagaccgt caccataaca caggatcctt aaccactga gcaaggtcag	120
ggatcaaacc caaatcctca tggatactag tcgggttctt aaccgctga gccacagtgg	180
gcactectgt tttgtttgt gtcttcgttt ttggctgca tctgcagcat acagaagtcc	240
ctgggttaag gattgaacct atgccacagc agcaaccga gccacagcag tgacaacagc	300

Sequence Listing

ctgatcccta actgctagac caccagggaa cgccectca acttttcatg ccttggaac	360
cctgagtcag tacaacctga caatngnttt tttttttttt tttttttgcc ttttctaggg	420
ccacttcccg cggcatgtgg agattcgag gctanaggtc taatcggagc tgtagccacc	480
ggcctacacc agagccatag caacgagggg tccgagccga gtctgcaacc tacactacag	540
ctcatggcaa caccggatcg ttaaccact gagcaaggcc aggggatcga acccgcaacc	600
tcattgggtcc tagtcagatt cgttaaccac tgcacctga caggaactcc caacctgaca	660
attttatcat ttctgcaccc tagttgttga gtaatttgaa aaattcccaa gatgtcaagg	720
tcagtgtgat ggttaatttt atgtgtcaac ctgactaggc catgttgccc ggatgtggag	780
tcattgttat tctggatgtt actgtgaaga tatgttttgg atgaaattaa catttaaate	840
agtgggggga aaaaaagaag ttctcgttct ggtgcatcag aaacaaatcc gactaggaaa	900
caagcgggtg caggttcgat ccttggcctc acttagtgga gtcaggatct ggcgttgccg	960
tgagctgtgg tacagggtggc agatgcagct cggatctagc attgctgtgg ctgtggtgta	1020
ggccagcagc tgtagctctg attaaacccc aagtctggga acctccatat gccgtgggtg	1080
tggccccgaa aagcaaaaaa taaataaata aataaattta aaccagggga ttttgagcaa	1140
agcagattac ccataatat ggggtgggtct catcaagttc attgtaggcc ctagtggaac	1200
aaagaccgac ctccaccttc tccccatgag aaggaaagaa ttctgccaaa agaccgcctt	1260
nggaentaaa ctgcaactct ttctgagtt tccagcatgt tggcctcccc catcagactt	1320
tggacttgcc aagcctccgc aattgcatga gccaatcct taaaataaat ccgtctatat	1380
atacacatcc tgttgggtct gtttctccag agaaccctga ctaacgcagt ctgcacccct	1440
gaagaccagt ggtccccaca ctcagctggg tgtcacctcc aaacactcag ccttcctcaa	1500

Sequence Listing

ggctctttct agctgtgtcc tctctcccc acaacagctg ttcaaaactc tcacccctct	1560
tcagggcgca atcccttctc ctccctgagt ttctacttc ccagagaaag cagagacctt	1620
caggagtgtg ctgccttaac ttacttctt catccctcag ccttgcaaaa gtataagctt	1680
tctctgcacc actgccccat tcttctctct gcagacaggg tcattcctaa agccaaacgc	1740
taatgcctcc acctctgac tgagtcccat cttttccctc ctccagaagc ttctcataa	1800
attctacccc cttttcttcc ttatctttat ctttgaaaac aaaatggaag acagccttcc	1860
cgttgtggtg cagcggaac agtgggtgct tgggaagcgt gggacgcagg ttcgaccct	1920
ggcccagcat agtaggttaa ggatccagt ttgccacagt ttggccttag attgaaactg	1980
cagctcagat ctggtccctg gcctgggaac ttcatacgcc acaggacggc ccaaaaagaa	2040
aagaaagaaa aaataaaaaa caaacagaa aagcctttcc tgtaccccca attccctcca	2100
gttatctctc tctttccctt ccagccaag ctctgcaaag agcggctgc acagttctaa	2160
ctctacctcc tcccagttgg ccctggactt tctcagctg gcttctaccc cctcaccg	2220
taggaatctg ctctgaagga cagcaccccc tcacgatcct tggcccagg acattttttg	2280
taccagcctt tcaatctga cttcatatc atccgacacc tcctttgtga aaccctccat	2340
ccaatttctc ctggttcccc tctaagacc cattccgctt tcttcagccc cctccctcca	2400
tctgtccttt agatgcgca ttctctagta tctgtctctg cgcggnetcg tccttccctt	2460
ccacaactct cttcaaggac tctttctcc atgtgcgatt ttgccatgg ccacettcc	2520
ctctctttac ccagacttcc cccggtgct ccagactcat agactcaatt atgaaaacat	2580
agttttctc tgatttgccc aagatatttg cattagttat tactgtataa cagcttatcc	2640
cccaatttag tggettataa aataaacact tattctgaga atcagaaacc taggcaggac	2700

Sequence Listing

atagttgggg tctcatgaag ttgcactgaa aatgtccccc tgggctaatac atacggagga	2760
ctgaccaggg ctggaggatc tgttccaagc tcattcattc acatggccgt aggttgaga	2820
cagctcttct ctggatcttg gcaggagcct caattccttg tcacgtggac ctccccttg	2880
aggggggtccc atgtcctcca tggtagtaa tccatgagag caaggtggaa ggtgccatgc	2940
catttaggac ctacgctcag gagggaccta cgtcacttct gttgtagtct gttggccaca	3000
cagactaacc ctgacacaat gcacccatcc atgacctgct gccagtccat tctccacact	3060
gtttccagaa tgatatttac ataagtaaaa ctccctcaaag gcttttgaga tttttttcc	3120
cattatagtt gatttataac ctgagaggt tttgttttct tcagcataaa aaccaagttc	3180
cttaacatag catgtaaccc actggccacc ctgccagtgg ctagaactct caccatgtcc	3240
atccttgaat actgctttct agccaagagc tattgtttgc agtcccaga atgtgtcggg	3300
ataactcaca tctctgagcc ttttcatgtg ctgttccctc actttggaat atccccttc	3360
atttaggaag gctaattgct attcatntc caaaactcag aagcaaattt ttttttttt	3420
tttttttttt ttttttgc ttttagggcc gaactctcag catatggagg tcccaggtt	3480
agccatcaaa ttggaattgt agctgctggc ctacaccaca gccatagcaa caccagacc	3540
aagtcacatc tgcaacctac atcacagatc atggcaatac tggatcctta accactgag	3600
tgagcccagg gatcaaacac aaattctcat ggatactcgc cagggttcatt accactgagc	3660
cacaacagga actcctctcc tttttatggt cacacctgca gcatatggaa gttcctgggc	3720
cagggattga atctgagtgg cagctgtgac aatgccgtat cctttaattc actgtgctgg	3780
gctgaggggn taaantgccc ctccataaaa acctgagctg ctgcagttgg attcttaac	3840
cactgcacca caagggggaa ggtcaagaac tgtcttgcca tctctgtatc ttatcaccta	3900

Sequence Listing

gcatagtacc caccatagag aagttgctca acaaatgttt actgaatgaa taaatgcatg	3960
agctggagtt ccattgcgg ctacagcagta acaaacctga ctagcattca taagaacttg	4020
ggttcgatcc ctacgtcag tgggttaagg atgcagcatt gctgtgagct gtgggtgtagg	4080
tgcgagacga cactcagatc ccacattgct gtcactgtgg cgcaggccgg cctctgtagc	4140
tctgattcga ctectagcct gggaacgtcc atatgccaca ggtgaggccc taaaaagaaa	4200
taaataagca agcaagtaag caagcaggca gtttcttggt gccttgtagc cctgtggcct	4260
gtgtggtata caagtaacag ctgatccatg tctcagtcac gtttccccct cagactacct	4320
ttcttgcccc atctctccct ttgacataat tggaaaaaca aattcagaat ttgtgccac	4380
tacctttctt gctagctctg tggccttggg aaagctattt attgcctctg agcctcta	4440
tttcatctgc accaaggatt aataaaaagg agaggataag atgaattact tatattaata	4500
tttattgaac cagatactgt gctaggcact cttaaataaa ttagcttgag tgatagtcac	4560
agtatcctgg tgagacagat ttttttttct cttttatggt tgcacgtgca acatatggaa	4620
gttcctgggc tggggtcgaa ttggagctgc aggtgcttgc ctatgccaca gccatggcaa	4680
catcatatac aaaccgcacc tgtgacctac accacagatt gcagcaacgc tggatccttc	4740
acccaaggag caaggccagg aatcaaatgt gcatcctcac aaacactatg tccggttttt	4800
aaccgctga gccacaccag gaactccatg gcgagacaga ttttatactc tgtctacaga	4860
agaggaaagt gaagctcaga atggttaggt aggtaacttg gccaaatca aaaaattcaa	4920
agaagatttg gggcaagtgg tgatatcatg gcagcattag aaaaaataaa gaagcatcca	4980
ctgtttttcc aacactgaac aactgagatt ttcttactct cacagctttt tccagcttca	5040
tatccaagga cagacgtctt gccattttcc catcagacca atatttgcctg aacactgcac	5100

Sequence Listing

ctttactttt aggtccaagt caccaggggt ttcccagtt tgcctctaca gattctgaca	5160
ctatctccac atcttttttg cacttttatt ttaaagcatt ttataacctg tcataccttg	5220
ctagataaat ggaaggaat gaatcttccc atttataggt gagaaaattg aggttcaaag	5280
tgactcacca aaagtcatat agcatcactc ctcaacagga ggacagcagt ccccaccaga	5340
gggtaacatg tccatggagc ctagtggaca catttttcta actgactggg aagcagcaga	5400
gtggtattgt gaagggggaa tcataggtat atcaaacaga cttaggttct gatccgagct	5460
attctgcttg caaacaacca tagttcaatt taataaaaaa aaagaaagaa agaaagaaag	5520
aaaggagccc ccatcctggt gcagtggaaa caaattcaac taggaactgt gaggttgttg	5580
gttcgatccc tggccttgct cagtgggtta aggatctggc gttgccatga gccgtggtgt	5640
aggttgacga ctcaactcag atctggcgtt gctgtgactg tggctgtgat gtaggctggc	5700
agctgtaact ccggttagac cccagcctgg gaacctccat atgcaacctc catatgcggt	5760
gggtgtggcc ctaaaaagaa aaaaaaaaaa aaaagaggaa ttcccttatg gctcagcagg	5820
ttaaggatct ggtattgtca ctgctgtggc tctagttaca gccatagtgc aggttcaatc	5880
cctggcccag gaacgtctgc atcccacagg tgtggccaaa aaagaaagaa aggaaggagt	5940
tctgttgttg cacaaatagga ttggcaacat cttaggagta ctgggacaca ggttcaatcc	6000
ctggcccagc acagtgggta aggagccagt gttgctggtc aaaaaagaaa agaaaaagta	6060
ccatagttag agtaaatctg ttttaggagc tattcttttg ggcagaacag agagatcagg	6120
agctccttga gagcagaaac ttacctttac atccctcgtg cctagcacgg ttctaggggc	6180
atacctggtg ttaataaat atagccaact ggatagggga ttggaaggaa agagcagggg	6240
agggaaactg agtgagtga aaaattgaga atccaaaggg gagacagcct agaaagagta	6300

Sequence Listing

ggccaagaa agagatccca ggcatttgtg gccctggttc ctttttcca agccatgagg	6360
aaatcctcag aggaacagag tgctgtggct ttaaagtact tcagcgttgt caatgaatct	6420
gctcggctaa aagagttatc ctcttgetcc ttctgttgtc ctccccctcc tctcagctcc	6480
ccaaaccctt ctcggtgct gtgatgggat aattagatgc gagagctcag cacagatgat	6540
gctccagttg cctagcaact aatgggttcc atggagaccg caaagcacag cctccagagc	6600
agccagttag cagctcggca gggcagggag aagaacgaac tctcagctcc tccagaaacc	6660
tggggagggc caggagtggg gaagaagggg gggatcggag ggcttaaagg cacaggcccc	6720
tcttatcttc ttaaaatctg gtcagagctc tgccctcccc tccctactc tgtcccactc	6780
ataatttcag atggagtggg gggcttagga gtggacccta cacaacctac cctgcaataa	6840
acccaacctt ctttctgctt ctggtttgtg gctgaaaatg gnaaaagaaa tctcccaagt	6900
gcaagtgtaa acanctcct gggttggcaa tgggatctga agagtactaa gatccctcag	6960
acctggaatt ccaccattta gtctttccct ctctccaaag ttctcaatgt gcaaaagatc	7020
ctctttcagt ttgcagagca atgataggat cttctaaaag gagacaaaag ccaagggtgca	7080
ggaaaaatag aattcagttc ttcaccctaa ggcagcctgt cctgggagac aggggtgaaa	7140
cacttggtcc tgatctccat cagaggatcc agagtgtgtg tgtttgttgc tggggagggg	7200
gacacaatat agagcatctg gtgactcaaa gtatgtgect cccagagtag catcaatcaa	7260
tgttacctgg aagcttgta gaaatgcaga atttcaggct tcacctcaga cccactgaat	7320
cagaaactgc atcttaacaa gatccctcat gattcatacg cacattaaat ttggagaagc	7380
gctgaactga gacctcttc ctctctgctt gggcccatag ttctacctt attgtcacct	7440
cgtctcacct cgtgtcata cccaggtt tgagctacc cttccccca tggggaagg	7500

Sequence Listing

acacaaggcc accagccct cacttcccta ccaggaccct ggcctccctc tgggactgga	7560
gaaggacaaa gaggaccccc tctgtggagg tctacgacct ctctgacca agtagtcac	7620
tcaccacaag tggctctacc tctctgagtc tcagtttcca catccacaaa aggtggccaa	7680
tgctatctgc caccagaat ggctgtgagg gtggagcagg caaagcctct gtgccatcag	7740
agaaattgtg tctctttttc attttctccc agtgggtttc tttctcgtct ttattctttt	7800
ttttttttt ttttctgtc tgttgtattt ttagggcgt gcctgtggca tacggaagt	7860
cccagggtag gggtecaatg ggagctgtag cccgggect acgccacagc cacagcaatg	7920
tgggatctga gccacgtctg caacctacac cacagctcac ggcaacacca gatccttaac	7980
ccactgagca aggccaggga tcgagccac gtcctcatgg atgctagttg ggttcgttaa	8040
ccgtgagcc atgatgatan ctctctttc tattctttag tcacaaacag tcaacaagg	8100
ttgctgacca aggtgatcg tgccacccc ccagccccc agactgggc agtgcacac	8160
ccttgggtct ctctggaaat cctgcccagc atcaattggc tccactctcc aggaggatgg	8220
gaagccctgt gggccctggg actcacaccc ctctgcatct cccagagtgc aggacctgt	8280
cttcaggaga caccaagaac tggctcccc ggctctgctg ccccccccc ctactaccag	8340
ttctctccc attcctgccc agtccagcc cctgggggtt actctcctct ctctgtacac	8400
cagtgaacc tcagaacctg cttccctcct gggacacccc actaccacgt gggagaagg	8460
gtcgtctagg ggttgggccc cagatacact tgttaagcagg aacacacgag cccttacatg	8520
tgggtgtccc ggaagaagg ggttttccac ccccgcttt agtcaccctg cccctctgca	8580
gctgcctgag ccaccaagac ccagccaagg tctcctgcct tctggcctga gggccagctc	8640
cccatcctga aaaacctgtc tgggggcctc ccctgaggct gtagggccca aggcctcccc	8700

Sequence Listing

tgaggctgta gggcccaagg ggcaggttga acaggattcc cctctggccc ctctacccc 8760

caggacaaaa ccagagcccc aggacagggc ctcaattgcc tcaggaaacc acagcttgcc 8820

agcaccagc ccagcaccag cccagct 8847

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying porcin uroplakin II gene

<400> 2

gacctgatt ctgctggctb 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying porcin uroplakin II gene

<400> 3

atggtggtca tcacrgtgct 20

<210> 4

<211> 3602

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<300>

<301> Lin, F. K.

Sequence Listing

Suggs, S.

Lin, C. H.

Browne, J. K.

Smalling, R.

Egrie, J. C.

Chen, K. K.

Fox, G. M.

Martin, F.

Stabinsky, Z.

<302> Cloning and expression of the human erythropoietin gene

<303> Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

<304> 82

<305> 22

<306> 7580-7584

<313> 1-3602

<400> 4

aagcttctg gcttcagac ccagctactt tgcggaactc agcaaccag gcatctctga	60
gtctccgccc aagaccggga tgccccccag gggaggtgtc cgggagccca gcctttccca	120
gatagcacgc tccgccagtc ccaagggtgc gcaaccggtc gcactccctt cccgcgaccc	180
agggcccggg agcagcccc atgaccaca cgcacgtctg cagcagcccc gctcacgccc	240
cggcgagcct caaccaggc gtcttgcccc tgccttgacc ccgggtggcc cctaccctg	300
gcgacccctc acgcacacag cctctccccc acccccaccc gcgcacgcac acatgcagat	360
aacagccccg acccccgccc agagccgcag agtccctggg ccaccccggc cgctcgctgc	420
gctgcgccgc accgcgctgt cctcccgag ccggaccggg gccaccgcgc ccgctctgct	480
ccgacaccgc gccccctgga cagccgccct ctctctagg cccgtggggc tggccctgca	540
ccgcccagct tcccgggatg agggcccccg gtgtggtcac ccggcgcgcc ccaggtcgct	600
gagggacccc ggccaggcgc ggagatgggg gtgcacggtg agtactcgcg ggctgggcgc	660

Sequence Listing

tcccgcgcgc cgggtccctg tttagcggg gatttagcgc cccggctatt ggccaggagg	720
tggtcgggtt caaggaccgg cgacttgta aggaccccg aagggggagg ggggtggggc	780
agcctccacg tgccagcggg gacttggggg agtccttggg gatggcaaaa acctgacctg	840
tgaaggggac acagtctggg ggttgagggg aagaagggtt ggggggtctg ctgtgccagt	900
ggagaggaag ctgataagct gataacctgg gcgctggagc caccacttat ctgccagagg	960
ggaagcctct gtcacaccag gattgaagtt tggccggaga agtggatgct ggtagctggg	1020
ggtaggggtg gcacacggca gcaggattga atgaaggcca gggaggcagc acctgagtgc	1080
ttgcatggtt ggggacagga aggacgagct ggggcagaga cgtggggatg aaggaagctg	1140
tccttcaca gccaccttc tccctcccg cctgactctc agcctggcta tctgttctag	1200
aatgtcctgc ctggctgtgg ctctcctgt ccctgctgtc gctccctctg ggcctccag	1260
tcctgggcgc ccaccacgc ctcatctgtg acagccgagt cctggagagg tacctcttgg	1320
aggccaagga ggccgagaat atcacggtga gaccccttc ccagcacatt ccacagaact	1380
cacgctcagg gcttcaggga actcctccca gatccaggaa cctggcactt ggtttgggt	1440
ggagtggga agctagacac tgcccccta cataagaata agtctgggtg ccccaaacca	1500
tacctgaaa ctaggcaagg agcaaagcca gcagatcta cggcctgtgg gccaggcca	1560
gagccttcag ggaccttga ctcctgggc tgtgtgcatt tcagacgggc tgtgtgaac	1620
actgcagctt gaatgagaat atcactgtcc cagacaccaa agttaatttc tatgcctgga	1680
agaggatgga ggtgagttcc ttttttttt ttttccctt cttttggaga atctcatttg	1740
cgagcctgat tttggatgaa agggagaatg atcgggggaa aggtaaaatg gagcagcaga	1800
gatgaggctg cctgggcgca gaggctcacg tctataatcc caggctgaga tggccgagat	1860

Sequence Listing

gggagaattg cttgagccct ggagtttcag accaacctag gcagcatagt gagatcccc	1920
atctctacaa acatttaaaa aaattagtca ggtgaagtgg tgcattggtgg tagtcccaga	1980
tatttggaag gctgaggcgg gaggatcgtc tgagcccagg aatttgaggc tgcagtgagc	2040
tgtgatcaca ccactgcact ccagcctcag tgacagagtg aggcctgtc tcaaaaaaga	2100
aaagaaaaaa gaaaaataat gagggctgta tggaatacat tcattattca ttcactcact	2160
cactcactca ttcattcatt cattcattca acaagtctta ttgcatacct tctgtttgct	2220
cagcttgggtg ctgggggctg ctgaggggca ggaggagag ggtgacatgg gtcagctgac	2280
tcccagagtc cactccctgt aggtcgggca gcaggccgta gaagctctggc agggcctggc	2340
cctgctgtcg gaagctgtcc tgcggggcca ggccctgttg gtcaactctt cccagccgtg	2400
ggagccctg cagctgcattg tggataaagc cgtcagtggc ctctgcagcc tcaccactct	2460
gcttcgggct ctgggagccc aggtgagtag gagcggacac ttctgcttc cctttctgta	2520
agaaggggag aagggtcttg ctaaggagta caggaactgt ccgtattcct tccctttctg	2580
tggcactgca gcgacctcct gttttctcct tggcagaagg aagccatctc ccctccagat	2640
gcggcctcag ctgctccact ccgaacaatc actgctgaca ctttccgcaa actcttccga	2700
gtctactcca atttcctcctg gggaaagctg aagctgtaca caggggaggc ctgcaggaca	2760
ggggacagat gaccaggtgt gtccacctgg gcatatccac cacctccctc accaacattg	2820
cttgtgccac accctccccc gccactcctg aaccccgctg aggggtctctc agctcagcgc	2880
cagcctgtcc catggacaact ccagtgccag caatgacatc tcaggggcca gaggaactgt	2940
ccagagagca actctgagat ctaaggatgt cacagggcca acttgagggc ccagagcagg	3000
aagcattcag agagcagctt taaactcagg gacagagcca tgctgggaag acgcctgagc	3060

Sequence Listing

```

tcactcggca cectgcaaaa ttgatgccca ggacacgctt tggaggcgat ttacctgttt      3120
tcgcacctac catcagggac aggatgacct ggagaactta ggtggcaagc tgtgacttct      3180
ccaggtctca cgggcatggg cactcccttg gtggcaagag ccccttgac accggggtgg      3240
tgggaaccat gaagacagga tgggggctgg cctctggctc tcatggggtc caagttttgt      3300
gtattcttca acctcattga caagaactga aaccaccaat atgactcttg gcttttctgt      3360
tttctgggaa cctccaaatc ccttggtctt gtcccactcc tggcagcagt gcagcaggtc      3420
caggtccggg aaatgagggg tggagggggc tgggccctac gtgctgtctc acacagcctg      3480
tctgacctct cgacctaccg gcctaggcca caagctctgc ctacgctggg caataagggt      3540
tctccattca aggcctcacc gcagtaaggc agctgccaac cctgccagg gcaaggctgc      3600
ag                                                                           3602

```

```

<210>      5
<211>    1916
<212>      DNA
<213>    Gallus gallus

```

```

<220>
<221>    misc_signal
<222>    (1)..(1916)
<223>    beta-globin insulator

```

```

<400>      5
ggggccgcgc gcgtcagggt gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaacc ctatttgttt      60
atattttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct      120
tcaataatat tgaaaaagga agagtcctga ggcggaaaga accagctgtg gaatgtgtgt      180
cagttagggg gtggaaagtc ccagggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat      240

```

Sequence Listing

ctcaattagt cagcaaccag gtgtggaaag tccccaggct cccagcagg cagaagtatg	300
caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc atagtccgc cctaactcc gccatccc	360
cccctaactc cgcccagttc cgccattct cgcgccatg gctgactaat tttttttatt	420
tatgcagagg ccgaggccgc ctggcctct gagctattcc agaagtagtg aggaggttt	480
tttgagggcc taggcttttg caaagatcga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcat	540
gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg	600
ctatgactgg gcacaacaga caatcggtg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc	660
gcaggggccc ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca	720
agacgaggca gcgcggctat cgtggctggc cagcagggc gttccttgcc cagctgtgct	780
cgacgttgcc actgaagcgg gaagggaactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga	840
tctcctgtca tctcaccttg ctctgcccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg	900
ggggctgcat acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat	960
cgagcgagca cgtactcgga tggaaagccgg tcttgctgat caggatgatc tggacgaaga	1020
gcatcagggg ctgcgccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgagca tgcccagcgg	1080
cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccc aatatcatgg tggaaaatgg	1140
ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat	1200
agcgttggtt acccgtgata ttgctgaaga gcttgccggc gaatgggctg accgcttcct	1260
cgtgctttac ggtatcgccg ctcccattc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga	1320
cgagttcttc tgagcgggac tctggggttc gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg	1380
ccatcacgag atttcgattc caccgccgcc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcggt	1440

Sequence Listing

```

ttccgggacg ccggetggat gatcctccag cgcggggacg tcatgctgga gttcttcgac 1500
caccctaggg ggaggctaac tgaaacacgg aaggagacaa taccggaagg aaccgcgct 1560
atgacggcaa taaaaagaca gaataaaacg cacggtgttg ggtcgtttgt tcataaacgc 1620
gggggttcggt ccaggggctg gcactctgtc gatacccccac cgagacccca ttggggccaa 1680
tacgcccggg tttcttcctt ttccccaccc cccccccaa gttcgggtga aggccaggg 1740
ctcgacgcca acgtcggggc ggcaggccct gccatagcct caggttactc atatatactt 1800
tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cttttttgat 1860
aatctcatga ccaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc cgatcg 1916

```

<210> 6

<211> 2254

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cloning vector pEGFP-N1, complete sequence, enhanced green fluorescent protein (egfp) and neomycin phosphotransferase genes

<400> 6

```

tcgactctag agggacagcc ccccccaaa gccccagggt atgtaattac gtccctcccc 60
cgctaggggc agcagcgagc cgcccggggc tccgctccgg tccggcgctc ccccgcac 120
cccagccggg cagcgtgagg ggacagcccg ggcacgggga aggtggcacg ggatcgcttt 180
cctctgaacg cttctcgctg ctctttgagc ctgcagacac ctggggggat acggggaaaa 240
agcttttagc tgaaagagag atttagaatg acagaatcat agaacggcct gggttgcaaa 300
ggagcacagt gctcatccag atccaacccc ctgctatgtg cagggtcatc aaccagcagc 360

```

Sequence Listing

ccaggctgcc cagagccaca tccagcctgg ccttgaatgc ctgcagggat ggggcatcca	420
cagcctcctt gggcaacctg ttcagtgcgt caccaccctc tgggggaaaa actgcctcct	480
catatccaac ccaaacctcc cctgtctcag tgtaaagcca tcccccttg tcctatcaag	540
ggggagtttg ctgtgacatt gttggtctgg ggtgacacat gtttgccaat tcagtgcac	600
acggagagggc agatcttggg gataaggaag tgcaggacag catggacgtg ggacatgcag	660
gtgttgaggg ctctgggaca ctctccaagt cacagcgttc agaacagcct taaggataag	720
aagataggat agaaggacaa agagcaagtt aaaaccacgc atggagagga gcacaaaaag	780
gccacagaca ctgctggtcc ctgtgtctga gcctgcatgt ttgatggtgt ctggatgcaa	840
gcagaagggg tggagagct tgcctggaga gatacagctg ggtcagtagg actgggacag	900
gcagctggag aattgccatg tagatgttca tacaatcgtc aaatcatgaa ggctggaaag	960
cctccaagat cccaagacc aacccaacc caccacccgt gccactggc catgtccctc	1020
agtgcacat cccacagtt ctcatcacc tccagggacg gtgaccccc cactccgtg	1080
ggcagctgtg ccactgcagc accgctcttt ggagaaggta aatcttgcta aatccagccc	1140
gacccctccc tggcacaacg taaggccatt atctctcacc caactccagg acggagtcag	1200
tgaggatggg gctctagagg gacagcccc ccccaaagcc cccagggatg taattacgtc	1260
cctccccgc taggggcagc agcagccgc ccggggctcc gctccgtcc ggcgtcccc	1320
ccgcatcccc gagccggcag cgtgcgggga cagccgggc acggggaagg tggcacggga	1380
tgcctttcct ctgaacgctt ctgctgtc tttgagcctg cagacacctg gggggatacg	1440
gggaaaaagc tttaggctga aagagagatt tagaatgaca gaatcataga acggcctggg	1500
ttgcaaagga gcacagtgt catccagatc caacccctg ctatgtgcag ggtcatcaac	1560

Sequence Listing

```

cagcagccca ggetgccag agccacatcc agcctggcct tgaatgcctg cagggatggg      1620
gcatccacag cctccttggg caacctgttc agtgcgtcac caccctctgg gggaaaaact      1680
gcctctcat atccaaccca aacctccct gtctcaggtt aaagccattc ccccttgtcc      1740
tatcaagggg gagtttctg tgacattgtt ggtctggggg gacacatgtt tgccaattca      1800
gtgcatcacg gagaggcaga tcttggggat aaggaagtgc aggacagcat ggacgtggga      1860
catgcagggtg ttgagggttc tgggacactc tccaagtcac agcgttcaga acagccttaa      1920
ggataagaag ataggataga aggacaaaga gcaagttaaa acccagcatg gagaggagca      1980
caaaaaggcc acagacactg ctggtccctg tgtctgagcc tgcattgttg atggtgtctg      2040
gatgcaagca gaaggggttc atgtccctca gtgccacatc cccacagttc ttcattacct      2100
ccagggacgg tgaccccccc acctccgtgg gcagctgtgc cactgcagca ccgtctttg      2160
gagaaggtaa atcttgctaa atccagcccg accctccctt ggcacaacgt aaggccatta      2220
tctctcatcc aactccagga acggagtcag tgag                                     2254

```

<210> 7

<211> 632

<212> DNA

<213> Woodchuck hepatitis B virus

<220>

<221> misc_signal

<222> (1)..(632)

<223> woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element

<400> 7

```

accaggttct gttctgttta atcaacctct ggattacaaa atttgtgaaa gattgactgg      60

```

Sequence Listing

```

tattcttaac tatgttgcgc cttttacgct atgtggatac gctgetttaa tgcctttgta      120
tcattgctatt gcttcccgta tggctttcat tttctcctcc ttgtataaat cctgggtgct      180
gtctctttat gaggagtgtg ggcccggtgt caggcaacgt ggcgtggtgt gcactgtgtt      240
tgctgacgca acccccactg gttggggcat tgccaccacc tgtcagctcc tttccgggac      300
tttcgctttc cccctcccta ttgccacggc ggaactcacc gccgcctgcc ttgcccgctg      360
ctggacaggg gctcggctgt tgggcactga caattccgtg gtgttgcgg ggaagctgac      420
gtcctttcca tggctgctcg cctgtgttgc cacctggatt ctgcgcggga cgtccttctg      480
ctacgtccct tcggccctca atccagcgga ccttccctcc cgcggcctgc tgccggctct      540
gcggcctett ccgcgtcttc gccttcgcc tcagacgagt cggatctccc ttggggccgc      600
ctccccgcct gtttcgcctc gggtctctcg ag      632

```

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying neomycin resistant gene

<400> 8

gcggcgcgc gcgtcagggtg gcac

24

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

Sequence Listing

<223> reverse primer for amplifying neomycin resistant gene

<400> 9

cgatcggacg ctcaagtggaa cgaaaactc

29

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying chicken B-globin insulator

<400> 10

tcgactctag agggacag

18

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying chicken B-globin insulator

<400> 11

ctcactgact ccgttcct

18

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying woodchuck hepatitis virus

Sequence Listing

posttranscriptional regulatory element

<400> 12

accagggttct gttectgtta atcaacctc

29

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying woodchuck hepatitis virus
posttranscriptional regulatory element

<400> 13

ctcgaggagc ccgaggcgaa acaggcg

27